

Aus der Klinik für Wiederkäuer  
mit Ambulanz und Bestandsbetreuung  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung

Vorstand: Prof. Dr. Holm Zerbe

# **Untersuchungen zur Endotoxintoleranz bei der akuten Mastitis des Rindes**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

von  
Tobias Pfister  
aus Memmingen

München 2009

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun  
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Zerbe  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Hermanns

Tag der Promotion: 17.Juli 2009

Gefördert aus Mitteln der Fa. Pfizer Animal Health Europe, Paris durch Personal- und  
Sachmittel.

## **Meiner Familie**

## INHALTSVERZEICHNIS

|   |           |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis .....  | IV        |
| Abkürzungsverzeichnis .....   | VII       |
| <b>1</b>  | <b>1</b>  |
| <b>    EINLEITUNG</b>   |           |
| <b>2</b>  | <b>2</b>  |
| <b>    LITERATURTEIL</b>  |           |
| 2.1   | 2         |
| Die <i>E. coli</i> -Mastitis des Rindes .....                           |           |
| 2.1.1   | 2         |
| Bedeutung .....   |           |
| 2.1.2   | 2         |
| Pathogenese .....   |           |
| 2.2   | 4         |
| Lipopolysaccharid (LPS) als Erregermuster .....                         |           |
| 2.2.1   | 4         |
| Lipopolysaccharid .....   |           |
| 2.2.1.1   | 4         |
| Die allgemeine Struktur von LPS .....                                   |           |
| 2.2.1.2   | 5         |
| LPS von <i>E. coli</i> .....  |           |
| 2.2.2   | 5         |
| LPS-vermittelte Effekte .....   |           |
| 2.2.2.1   | 5         |
| Allgemeine LPS-Effekte .....  |           |
| 2.2.2.2   | 6         |
| LPS-Effekte in der bovinen Milchdrüse .....                             |           |
| 2.3   | 7         |
| Erregererkennung durch Komponenten des angeborenen Immunsystems .....   |           |
| 2.3.1   | 7         |
| Toll-like-Rezeptor (TLR) vermittelte Erkennung von <i>E. coli</i> ..... |           |
| 2.3.2   | 9         |
| TLR-4-Signalkaskade bei Bindung von LPS .....                           |           |
| 2.3.3   | 11        |
| Regulierung der TLR-4-Expression .....                                  |           |
| 2.4   | 12        |
| Endotoxintoleranz .....   |           |
| 2.4.1   | 12        |
| Klinische Beobachtungen .....   |           |
| 2.4.2   | 13        |
| Molekulare Grundlagen der Endotoxintoleranz .....                       |           |
| 2.4.3   | 14        |
| Regulation des TLR-assoziierten Signalweges .....                       |           |
| 2.4.3.1   | 14        |
| Desensibilisierende Liganden im Plasma .....                            |           |
| 2.4.3.2   | 15        |
| Endotoxin-neutralisierende Moleküle im Plasma .....                     |           |
| 2.4.3.3   | 15        |
| NF- $\kappa$ B-Inhibition .....   |           |
| 2.4.3.4   | 16        |
| Herunterregulierung des TLR-assoziierten Signalpfades .....             |           |
| 2.4.4   | 18        |
| Aufhebung des endotoxintoleranten Zustandes .....                       |           |
| 2.4.5   | 18        |
| Immunmodulation mittels TLR-4-Agonisten .....                           |           |
| 2.4.6   | 19        |
| Experimente an Wiederkäuern .....                                       |           |
| <b>3</b>  | <b>22</b> |
| <b>    MATERIAL UND METHODEN</b>  |           |
| 3.1   | 22        |
| Geräte .....  |           |
| 3.2   | 23        |
| Materialien .....   |           |
| 3.2.1   | 23        |
| Klinikbedarf .....  |           |
| 3.2.2   | 23        |
| Laborbedarf .....   |           |
| 3.2.3   | 25        |
| Reagenzien, Medikamente und andere Verbrauchsmaterialien .....          |           |
| 3.2.4   | 25        |
| Puffer und Lösungen .....   |           |
| 3.2.4.1   | 25        |
| Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ohne EDTA .....                     |           |
| 3.2.4.2   | 25        |
| Wasch- und Verdünnungspuffer für die Membranimmunfluoreszenz .....      |           |
| 3.2.4.3   | 26        |
| Lösungen für die Durchflusszytometrie .....                             |           |
| 3.2.5   | 26        |
| Versuchstiere .....   |           |
| 3.2.6   | 27        |
| Modellbakterien .....   |           |
| 3.2.7   | 28        |
| Antikörper .....  |           |
| 3.3   | 29        |
| Methoden .....  |           |
| 3.3.1   | 29        |
| Tierschutzantrag .....  |           |
| 3.3.2   | 29        |
| Modellbedingungen und Voruntersuchungen der Probanden .....             |           |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.3.3    | Herstellung von LPS .....   | 29        |
| 3.3.4    | Herstellung der Inokulationsdosis von LPS .....   | 30        |
| 3.3.5    | Intramammäre Applikation von LPS .....  | 30        |
| 3.3.6    | Präparation der Infektionsdosis .....   | 30        |
| 3.3.7    | Experimentelle Infektion einzelner Euterviertel .....   | 31        |
| 3.3.8    | Gewinnung der Milchproben .....   | 31        |
| 3.3.9    | Erhebung und Beurteilung allgemeiner klinischer Parameter.....  | 31        |
| 3.3.10   | Erhebung und Beurteilung von Parametern am Euter.....   | 32        |
| 3.3.10.1 | Adspektion des Euters .....   | 32        |
| 3.3.10.2 | Palpation des Euters .....  | 32        |
| 3.3.10.3 | Beurteilung des Eutersekrets .....  | 32        |
| 3.3.11   | Bakteriologische Untersuchung des Eutersekrets .....  | 32        |
| 3.3.12   | Bestimmung von Inhaltstoffen und des somatischen Zellgehalts (SCC) der Milch  | 33        |
| 3.3.13   | Aufarbeitung der Milchproben für die durchflusszytometrische Zellcharakterisierung.....   | 33        |
| 3.3.14   | Durchflusszytometrie .....  | 33        |
| 3.3.15   | Vitalitätsbeurteilung und Quantifizierung der Milchezellen nach Acridin-Orange/Propidiumjodid-Färbung .....                             | 34        |
| 3.3.16   | Membranimmunfluoreszenz (MIF).....  | 35        |
| 3.3.16.1 | Vorbereitung der Milchproben für die Milchezellcharakterisierung mittels Membranimmunfluoreszenz.....                                   | 35        |
| 3.3.16.2 | Milchezellcharakterisierung durch Membranimmunfluoreszenz .....   | 36        |
| 3.3.17   | Klinische Labordiagnostik .....   | 37        |
| 3.3.18   | Progesteron- und Östrogenbestimmung .....   | 37        |
| 3.3.19   | Gewinnung von venösem Blut .....  | 38        |
| 3.3.20   | Gewinnung von Plasma aus peripherem Blut .....  | 38        |
| 3.3.21   | Statistische Verfahren .....  | 38        |
| <b>4</b> | <b>ERGEBNISSE</b>   | <b>40</b> |
| 4.1      | Etablierung eines Tiermodells zur Untersuchung der mammären Endotoxintoleranz .....   | 40        |
| 4.1.1    | Versuche zur Dosisfindung für LPS zur intramammären Anwendung.....  | 40        |
| 4.1.2    | Versuche zur Abhängigkeit des Zellgehalts vom Zyklusstand des Rindes.....   | 40        |
| 4.2      | Systemische und lokale Effekte der intramammären Inokulation von LPS.....   | 41        |
| 4.2.1    | Rektale Körpertemperatur .....  | 42        |
| 4.2.2    | Allgemeine klinische Symptome .....   | 42        |
| 4.2.3    | Milchleistung.....  | 43        |
| 4.2.4    | SCC der Milch nach LPS-Inokulation .....  | 44        |
| 4.2.5    | Sekretveränderungen nach intramammärer LPS-Inokulation .....  | 44        |
| 4.2.6    | Blutbild.....   | 45        |
| 4.3      | Einfluß einer intramammären LPS-Vorbehandlung („Priming“) auf die Etablierung einer experimentellen Mastitis durch <i>E. coli</i> ..... | 46        |
| 4.3.1    | Rektale Körpertemperatur .....  | 46        |
| 4.3.2    | Allgemeine klinische Symptome .....   | 48        |
| 4.3.3    | Blutbild.....   | 48        |
| 4.3.4    | Milchleistung.....  | 49        |
| 4.3.5    | Sekretveränderungen bei experimenteller <i>E. coli</i> -Mastitis .....  | 51        |
| 4.3.5.1  | Infizierte Viertel .....  | 51        |
| 4.3.5.2  | Nicht infizierte Viertel .....  | 52        |
| 4.3.6    | Bakteriologische Befunde in der Milch .....   | 52        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 4.3.7    | Somatischer Zellgehalt der Milch (SCC) im Infektionsverlauf .....  | 53         |
| 4.3.8    | Durchflusszytometrische Milchzellendifferenzierung .....   | 57         |
| 4.3.8.1  | Zellendifferenzierung mittels Acridin-Orange/Propidiumjodid-Färbung.....   | 57         |
| 4.3.8.2  | Milchzellendifferenzierung mittels Membranimmunfluoreszenz.....  | 62         |
| 4.4      | Langzeiteffekte einer <i>E. coli</i> -Infektion nach 10-tägigem „LPS-Priming“ .....  | 64         |
| <b>5</b> | <b>DISKUSSION</b>  | <b>67</b>  |
| 5.1      | Konzeptionelle Überlegungen.....   | 67         |
| 5.2      | Etablierung eines Mastitis-Modells.....  | 68         |
| 5.3      | <i>In vivo</i> -Versuche zum intramammären „LPS-Priming“ .....   | 70         |
| 5.3.1    | Direkte LPS-Effekte .....  | 70         |
| 5.3.2    | Ohne „LPS-Priming“ ist die Reaktion auf eine <i>E. coli</i> -Infektion einheitlich .....   | 71         |
| 5.3.2    | „LPS-Priming“ beeinflusst die Reaktion auf eine experimentelle <i>E. coli</i> -Infektion   | 71         |
| 5.3.3    | Protektive Effekte des „LPS-Priming“ im Euter sind zeitlich begrenzt.....  | 72         |
| 5.3.4    | „LPS-Priming“ beeinflusst die Reaktion nicht infizierter Viertel auf eine <i>E. coli</i> -<br>Infektion benachbarter Euterviertel..... | 73         |
| 5.3.5    | Differenzierung immigrierender Milch-Leukozyten nach „LPS-Priming“ und<br><i>E. coli</i> -Infektion .....                              | 74         |
| 5.4      | Schlussbetrachtungen und Ausblick.....   | 74         |
| <b>6</b> | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b>   | <b>76</b>  |
| <b>7</b> | <b>SUMMARY</b>   | <b>78</b>  |
| <b>8</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b>  | <b>80</b>  |
| <b>9</b> | <b>DANKSAGUNG</b>  | <b>108</b> |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                      |  |
|----------------------|--|
| μ                    | mikro (*10 <sup>6</sup> )  |
| Abb.                 | Abbildung  |
| <i>Aqua dest.</i>    | Aqua destillata (destilliertes Wasser)   |
| ATP                  | Adenosin-5'-triphosphat  |
| bzw.                 | beziehungsweise  |
| C3b                  | opsonisierendes Fragment der Komplementkomponente C3   |
| C5a                  | opsonisierendes Fragment der Komplementkomponente C5   |
| CD                   | Cluster of Differentiation   |
| CFU                  | Colony forming units (Kolonie bildende Einheiten)  |
| CMT                  | California Mastitis Test   |
| COX                  | Cyclooxygenase   |
| Δ                    | Differenz  |
| d                    | day (Tag)  |
| DNA                  | Desoxyribonukleinsäure   |
| <i>E. coli</i>       | <i>Escherichia coli</i>  |
| EDTA                 | Ethylendiamintetraacetat   |
| et al.               | et alii (und andere)   |
| FACScan <sup>®</sup> | Fluorescence-Activated Cell Scanner (Fluoreszenzaktiviertes Zellmessgerät der Firma Becton Dickinson, Heidelberg)  |
| FL-1, -2, -3         | Messkanäle des Durchflusszytometers für emittierte Fluoreszenz<br>FL-1=Grünfluoreszenz, 530±15 nm;<br>FL-2=Orangefluoreszenz, 585±21 nm;<br>FL-3=Rotfluoreszenz, >650 nm |
| FSC                  | Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht), Messparameter des FACScan <sup>®</sup>   |
| g                    | Gramm  |
| ggr.                 | geringgradig   |
| h                    | hora (Stunde)  |
| H <sub>2</sub> O     | Wasser   |
| hgr.                 | hochgradig   |
| HSP                  | Heat Shock Protein (Hitze-Schock Protein)  |
| i.d.R.               | in der Regel   |
| i.m.                 | intramuskulär  |
| IFN                  | Interferon   |
| Ig                   | Immunglobulin  |
| IL                   | Interleukin  |
| IL1RA                | Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist  |
| iNOS                 | induzierbare Stickstoff Synthetase   |
| JNK                  | c-JUN N-terminal Kinase  |
| Kdo                  | 2-Keto-3-desoxyoktansäure  |

|        |   |
|--------|---|
| kg     | Kilogramm   |
| l      | Liter   |
| LBP    | Lipopolysaccharid-Binding Protein   |
| LMU    | Ludwig-Maximilians-Universität  |
| LPS    | Lipopolysaccharid   |
| LTA    | Lipoteichonsäure  |
| m      | milli (*10 <sup>3</sup> )   |
| MAPK   | Mitogen-Activated Protein Kinase (Serine/Threonin-spezifische Proteinkinase)  |
| MEC    | Milchdrüsenepithelzelle   |
| mgr.   | mittelgradig  |
| MHC    | Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)           |
| MIF    | Membranimmunfluoreszenz   |
| Min.   | Minute(n)   |
| mTLR-4 | Alternatively Spliced Mouse TLR-4   |
| MyD88  | Myeloid Differentiation Factor 88 (myeloider Differenzierungsfaktor 88)       |
| mRNA   | Messenger RNA   |
| MW     | arithmetischer Mittelwert   |
| n      | nano (*10 <sup>-9</sup> )   |
| nm     | Nanometer   |
| n=     | bei Berechnung des Mittelwertes die Anzahl der Einzelbeobachtungen            |
| NaCl   | Natriumchlorid  |
| NET    | Neutrophil Extracellular Trap   |
| NFκB   | Nuclear Factor-Kappa B (Transkriptionsfaktor)                                 |
| NO     | Nitric Oxide (Stickstoffmonoxid)  |
| Nr.    | Nummer  |
| o.b.B. | ohne besonderen Befund  |
| OD     | optische Dichte   |
| p      | Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Analyse der Ähnlichkeit zweier Datengruppen |
| PAMP   | Pathogen Associated Molecular Pattern (Molekulare Muster von Erregern)        |
| PBS    | Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)                 |
| Pellet | Bodensatz; hier: durch Zentrifugation sedimentierte Zellen                    |
| PI     | Propidiumjodid  |
| PMN    | Polymorphonuclear Leukocytes (polymorphkernige neutrophile Granulozyten)      |
| Ref.   | Referenz  |
| ROS    | Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezies)                          |
| s.c.   | subkutan  |
| SCC    | Somatic Cell Count (Somatische Zellen in der Milch)                           |



|             |   |
|-------------|---|
| sCD14       | soluble CD14 (lösliches CD14)   |
| Sek.        | Sekunde(n)  |
| SEM         | Standard Error of the Mean (Standardfehler des Mittelwertes)              |
| SIRS        | Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom                           |
| s.o.        | siehe oben  |
| sog.        | sogenannte(r)   |
| spp.        | Spezies   |
| SSC         | Side Scatter (Seitwärtsstreulicht), Messparameter des FACScan®            |
| Stabw.      | Standardabweichung  |
| sTLR-4      | soluble TLR-4   |
| Tab.        | Tabelle   |
| Th1, Th2    | Bezeichnet den Phänotyp einer T-Helfer-Zelle 1 oder 2                     |
| TIR         | Toll-Interacting-Receptor   |
| TIRAP       | TIR-Domain-Containing Adapter Protein                                     |
| TLR         | Toll-like-Receptor (Toll-like-Rezeptor)                                   |
| TMR         | Totale Mischraktion   |
| TNF         | Tumor Necrosis Factor (Tumornekrosefaktor)                                |
| TOLLIP      | Toll-Interacting Protein  |
| TRAF6       | TNF-Receptor-Associated Factor 6  |
| TRAMP       | TNF-Receptor-Related Apoptosis Mediating Protein                          |
| TRIF        | TIR-Domain-Containing Adaptor Inducing IFN- $\beta$                       |
| u.a.        | unter anderem   |
| v.a.        | vor allem   |
| VAG         | Viertelanfangsgemelk  |
| VEG         | Viertelendgemelk  |
| vgl.        | vergleiche  |
| VIP         | vasoaktives intestinales Peptid   |
| $\tilde{x}$ | Median  |
| $\bar{x}$   | Mittelwert  |
| x g         | multipliziert mit der Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> ) |
| z.B.        | zum Beispiel  |
| z.T.        | zum Teil  |

## 1 Einleitung

Die Mastitis des Rindes zählt zu den verlustreichsten Einzeltierkrankungen in der Milchviehhaltung<sup>1</sup>. Sie tritt besonders häufig im peripartalen Zeitraum auf und ist oft nur unbefriedigend oder nicht therapeutisch zu beeinflussen<sup>2</sup>. Vor allem durch *Escherichia coli* (*E. coli*) ausgelöste akute Mastitiden verursachen in diesem Zeitraum hohe Verluste durch bleibende Schäden am Tier oder durch den Tod der Tiere.

Hierbei entsteht der größte Teil des Schadens nicht durch die Bakterien selbst, sondern durch eine Dysregulation der Abwehrvorgänge im Tier<sup>3</sup>. Die Vermehrung des eingedrungenen Pathogens findet zunächst ungebremst statt, da die Immigration von Phagozyten verzögert abläuft<sup>4</sup>. Die Folge ist eine höhere Freisetzung von Lipopolysaccharid (LPS) durch *E. coli* und eine dadurch unverhältnismäßig starke Immunreaktion von Seiten des Wirts. Therapeutisch versucht man diese Schäden durch die Gabe nichtsteroidaler Antiphlogistika oder Glukokortikoide einzugrenzen. Oftmals erfolgen die Gaben jedoch zu spät in diesem akuten, systemisch-inflammatorischen Geschehen.

Neue Behandlungskonzepte zur Verhinderung oder Linderung der *E. coli*-Mastitis sollten also einerseits auf eine optimierte Pathogenerkennung und eine schnellere Mobilisierung von Phagozyten abzielen. Andererseits darf es dabei nicht zu einer überschießenden, wirtsschädigenden Reaktion kommen.

Ein in diesem Zusammenhang interessanter, bei Säugetieren beobachteter Mechanismus ist die Endotoxintoleranz<sup>5</sup>: ein Organismus, der sich in einem bestimmten Zeitfenster mit Pathogenen oder Teilen von Pathogenen auseinandergesetzt hat, reagiert auf einen erneuten Kontakt mit Pathogenen schwächer als auf den Erstkontakt. Diesen Gewöhnungseffekt versuchte man in der Vergangenheit insbesondere beim Menschen für Prophylaxekonzepte bei septischen Erkrankungen zu instrumentalisieren<sup>6</sup>. Der Vorteil gegenüber dem alternativen Einsatz von Erreger-spezifischen Vakzinen könnte im pathogenübergreifenden Schutz liegen.

Ein Ziel der Arbeit war es, in einem neuen Ansatz ein sehr gut reproduzierbares Mastitis-Infektionsmodell beim Rind zu nutzen, mit dem sich neben klinischen Parametern auch Mechanismen des angeborenen Immunsystems vor dem Hintergrund der Endotoxintoleranz untersuchen lassen. Hierzu wurden nach streng gefassten Modellgrenzen ausgewählte Versuchstiere mit LPS intramammär vorbehandelt und die klinischen Auswirkungen auf die Tiere erfasst. Eine anschließende experimentelle Infektion mit *E. coli* sollte Aufschluss darüber geben, welche Rolle die Endotoxintoleranz bei der Mastitis des Rindes spielt und über welchen Zeitraum sie den klinischen Verlauf einer akuten experimentell induzierten *E. coli*-Mastitis beeinflussen kann.

Die vorliegende Dissertationsarbeit ist dabei Ausgangspunkt und Teil eines Gesamtkonzeptes der Arbeitsgruppe zur Mastitisforschung beim Rind. Eine gründliche Literaturlaufarbeitung der Problematik war deshalb ebenfalls Teilaufgabe der Dissertationsarbeit. In assoziierten und Nachfolgeprojekten werden zudem insbesondere die lokalen und systemischen Immunmechanismen der frühen Erreger-Wirtsinteraktionen in unserer und in kooperierenden Arbeitsgruppen analysiert. Schwerpunkte dabei sind Genexpressionsstudien an im Tiermodell gewonnenen Eutergewebeproben und begleitende *in vitro*-Experimente mit Milchdrüsenepithelzellkulturen. Längerfristiges Ziel ist es, die im peripartalen Zeitraum besonders gefährdete Kuh durch den gezielten prophylaktischen Einsatz von Modulatoren des angeborenen Immunsystems gegen die Folgen schwerwiegender Mastitiden zu schützen.

## 2 Literaturteil

### 2.1 Die *E. coli*-Mastitis des Rindes

#### 2.1.1 Bedeutung

Die Entzündung der Milchdrüse (Mastitis) des Rindes stellt eine der bedeutendsten und verlustreichsten Erkrankungen in der Milchproduktion weltweit dar. Nach Auswertungen in Deutschland erkrankt jährlich etwa jede dritte Kuh während der Laktation an einer Mastitis. Bezogen auf die durch Mastitiden entstehenden Kosten kann eine Belastung pro Liter produzierter Milch von ca. 0,02€ geschätzt werden, anfallende Mehrarbeit nicht mit eingerechnet<sup>7</sup>. Darunter bringen speziell die durch gram-negative umweltassoziierte Erreger und vor allem durch Stämme von *Escherichia coli* (*E. coli*) ausgelöste Entzündungen der Milchdrüse den Milchproduzenten jährlich große Verluste. Ein einzelner Fall von Mastitis durch *E. coli* kostet bei Totalverlust des Tieres schätzungsweise mindestens 1.800,--€, bei erfolgreicher Behandlung mindestens ca. 180,--€. In England und Wales wurden 2007 bei ca. 20% der klinischen Mastitiden *E. coli* isoliert<sup>1</sup>.

In Laufstallhaltungen finden sich mehr durch *E. coli* und *Klebsiella* ausgelöste Mastitiden als bei Rinderhaltung in Anbindeställen. Damit sind tendenziell größere Herden stärker betroffen, und es ist anzunehmen, dass deren Bedeutung weltweit weiter zunehmen wird. Laut einer kanadischen Studie sind niedrige Tankmilchzellgehalte zusätzlich ein Faktor, der diese Art der Mastitis begünstigt<sup>2</sup>. Besonders in den ersten Tagen nach der Kalbung ist die Anfälligkeit für Mastitiden besonders groß, und hier werden überproportional häufig umweltassoziierte Erreger isoliert. In diesem Zeitraum, in dem die Kuh auf ihre höchste Produktivität zusteuern soll, verlaufen diese Infektionen besonders folgenschwer<sup>8</sup>.

#### 2.1.2 Pathogenese

*Escherichia coli* (*E. coli*) ist ein gram-negatives, stäbchenförmiges, säurebildendes, Laktose-positives und Oxidase-negatives, peritrich begeißeltes Bakterium, das im menschlichen und tierischen Darm wie auch in deren Umwelt vorkommt. Es gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und besitzt die Fähigkeit, Energie sowohl durch Atmung als auch durch „Gemischte Säuregärung“ zu gewinnen. Diese Bakterien ernähren sich bevorzugt von Zucker und bestimmten Aminosäuren. Man unterscheidet drei Gruppen von Serotypen: „O“ für die Lipopolysaccharide (LPS), „H“ (von „mit Hauch wachsende Bakterien“) für die Flagellen und eventuell „K“ für die Kapsel. Es gibt ca. 180 „O“-Serogruppen und ca. 50 „H“-Typen bei *E. coli*. Die verschiedenen Serotypen von *E. coli* erschweren eine einheitliche Immunogenität des Erregers. *E. coli* ist Teil der Darmflora und gilt als fakultativ pathogen. Unter optimalen Bedingungen beträgt seine Generationszeit ca. 20Minuten. Vor dem Hintergrund der *E. coli*-Mastitis kann somit eine Stunde Verzögerung bei der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das Eutergewebe eine 8-fach größere Anzahl an *E. coli* bedeuten, die durch das Immunsystem zu bekämpfen sind<sup>9,10</sup>.

Schwere Verläufe der durch *E. coli* hervorgerufenen Mastitis treten vor allem im peripartalen Zeitraum auf, die therapeutisch oft nur unbefriedigend zu beeinflussen sind. Als prädisponierende Faktoren gelten Läsionen am Euter, Schweregeburten und Geburtsverletzungen, Fütterungsmängel, Energiedefizit, Witterungseinflüsse, Mängel in der Melktechnik und der Melkhygiene.

Vor allem in Rinderställen mit suboptimalen hygienischen Bedingungen herrscht hoher Keimdruck, insbesondere durch den Umweltkeim *E. coli*. Ist der Strichkanal nur unzureichend verschlossen, was ohne zusätzliche Maßnahmen nach dem Melken der Fall ist, und versagen die wirtseigenen Infektionsabwehrmechanismen des Rindes, können diese Bakterien leicht ins Euter eindringen und eine schwere Mastitis hervorrufen.

Auch gilt eine Besiedlung über den Blutweg als möglich. Dabei sollen die Erreger zum Beispiel durch geburtsbedingte Läsionen aus dem Darm abgeschwemmt und ins Euter transportiert werden.

Weder die Adhärenz am Drüsenepithel noch besondere Virulenzfaktoren scheinen notwendig zu sein, um eine Entzündung im Milchdrüsengewebe auszulösen. Es genügt die Fähigkeit, sich im Eutersekret vermehren zu können. Die Schwere der Erkrankung hängt dabei nicht vom Serotyp des Bakteriums ab, sondern korreliert mit der Höhe der Keimzahl in der Milch<sup>11,12</sup>.

Vorwiegend verläuft die *E. coli*-Mastitis als akute oder perakute, serofibrinöse Mastitis mit Störung des Allgemeinbefindens. Die Tiere zeigen hohes Fieber, Muskelzittern, frequente Atmung, Inappetenz, Pansenparese, Durchfall und tendieren zum Festliegen. Das Euter ist oft stark phlegmonös geschwollen, schmerzhaft und vermehrt warm. Starke Exsudation mit Parenchymnekrosen kann feststellbar sein; das Sekret ist deshalb wässrig bis eiersuppenartig. Die Krankheit schreitet sehr rasch voran und massive Krankheitssymptome können innerhalb weniger Stunden sichtbar werden. Oft treten bereits schwere Allgemeinstörungen auf, bevor Veränderungen am Euter feststellbar sind, mit Ausnahme einer Zellzahlerhöhung.

Der Verlauf der Erkrankung ist unterschiedlich. Ist das Immunsystem des betroffenen Tieres in der Lage, die Erreger schnell zu eliminieren, kann die Erkrankung milde und ohne bleibende Schäden verlaufen<sup>13</sup>. Die akute oder perakute Erkrankung kann in eine chronisch eitrig Mastitis übergehen, die nach Behandlung eventuell voll ausheilt, aber oft mit einem starken Milchrückgang verbunden ist. Trotz intensiver Behandlung kann es jedoch auch zu einem vollständigen Verlust der Parenchymfunktion des Eutergewebes kommen. Gerade bei hochleistenden Tieren im peripartalen Zeitraum wird oft ein perakuter oder akuter Verlauf beobachtet, der binnen einer Woche letal verlaufen kann<sup>13</sup>.

Hat sich nach laktogener Infektion *E. coli* im Euter etabliert, wird während des Wachstums und des Absterbens der Zellwandbestandteil LPS im Wirt freigesetzt<sup>14</sup>. Dieser wird durch verschiedene Zelltypen rezeptorvermittelt erkannt, die auf den Stimulus mit einer auf das Pathogen abgestimmten Zytokinausschüttung reagieren. Dies hat wiederum eine proinflammatorische Reaktionsweise des Immunsystems zur Folge.

Durch die Zytokinausschüttung werden vor allem polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) ins Eutergewebe gelockt. Diese verlangsamen in der Blutbahn ihre Fließgeschwindigkeit, rollen an der Zellwand entlang, haften an der Wand des Blutgefäßes und treten via Diapedese ins Eutergewebe über. Die PMN-Migration in die Milchdrüse allein führt dabei schon zur Beschädigung des milchbildenden Drüsenepithels und damit zur permanenten Verringerung der produzierten Milchmenge<sup>15</sup>. Die eingewanderten PMN wirken als Effektorzellen, da sie Bakterien phagozytieren und mittels ROS (engl. reactive oxygen species) töten. Ihre antimikrobiellen Granula fusionieren mit dem Phagosom, nachdem die Zelle das Bakterium aufgenommen hat. Reaktive Sauerstoffspezies reagieren dabei mit diversen molekularen Zielen des Pathogens. Eine exzessive ROS-Produktion verursacht Gewebeschädigungen und führt im Rahmen der Mastitis zum Verlust von milchbildendem Parenchym. Neuerdings ist bekannt, dass PMN Bakterien ebenfalls über die Formierung von

NET (engl. neutrophil extracellular traps) neutralisieren<sup>16</sup>. Nach Aktivierung entlassen PMN Granula mit Proteinen und Chromatin, die zusammen Bakterien-bindende extrazelluläre Fasern bilden können. Diese extrazellulären „Fallen“ bauen bakterielle Virulenzfaktoren ab und töten die Bakterien<sup>16</sup>.

## 2.2 Lipopolysaccharid (LPS) als Erregermuster

PAMPS (engl. pathogen-associated molecular patterns) sind Struktur motive oder Moleküle, die charakteristisch für ein breites Spektrum an Mikroorganismen sind und es dem Immunsystem ermöglichen, das Eindringen von Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten zu erkennen. In der Regel sind diese Struktur motive essentiell für diese Organismen und hochgradig konserviert. Bei PAMPs kann es sich um eine typische Anordnung von Zuckermolekülen, um Komponenten der Zellwand von Bakterien (Lipopolysaccharide), Peptide oder um Nukleinsäuren von Viren und Bakterien handeln<sup>17</sup>.

### 2.2.1 Lipopolysaccharid

#### 2.2.1.1 Die allgemeine Struktur von LPS

LPS (Endotoxin) ist eine hitzestabile, strukturelle Komponente der Zellwand, die in gleich aufgebauter Grundstruktur bei allen gram-negativen Bakterien zu finden ist. Die Konstruktion aus dem sogenannten Lipid A, einer inneren und einer äußeren Kernpolysaccharidregion und einer O-Polysaccharidkette stellt eine entwicklungsgeschichtlich alte, aber hoch-konservierte Struktur dar<sup>14</sup>. Setzt sich ein Säugetierorganismus mit gram-negativen Bakterien auseinander, so ist das LPS eines der ersten und wichtigsten Merkmale, an denen das angeborene Immunsystem das Pathogen erkennt. Das pathophysiologische Potential von gram-negativen Bakterien begründet sich so direkt in der Struktur des LPS<sup>18</sup>.

Das stark hydrophobe Lipid A stellt den endotoxisch aktiven Teil des Moleküls dar. Es besteht aus einem  $\beta$ -D-GlcN-(1-6)- $\alpha$ -D-GlcN-Disaccharid, das 2 Phosphorylgruppen trägt, die durch verschiedene Gruppen an Position 1 und 4' substituiert sein können. Der Polysaccharidanteil von LPS ist immer über einen Kdo-Rest (2-Keto-3-desoxyoktansäure), der an Position 6' angreift, an das Lipid A gebunden. Dieser phosphorylierte Diglucosamin-Hauptstrang, der an einen Kdo-Rest gebunden ist, stellt damit innerhalb des LPS-Moleküls den am stärksten konservierten Teil dar<sup>18</sup>.

Anzahl und Länge der Acyl-Ketten im LPS und der Phosphorylierungsstatus des Disaccharid-Hauptstrangs stellen Faktoren dar, die zur Endotoxizität beitragen. Stärkste Endotoxizität besitzt das Lipid A von *E. coli* und dabei das diphosphorylierte *E. coli*-ähnliche hexa-acyl Lipid A. Diese Struktur, die 2  $\beta$ (1-6)-gebundene D-Glucosamin-(GlcN oder GlcN3N)-Reste enthält, wird gut von Säugetier-Rezeptoren erkannt und entfaltet so das volle Spektrum an endotoxischer Aktivität. Sechs Fettsäuregruppen mit C<sub>12</sub>-, C<sub>12</sub>OH-, C<sub>14</sub>- und C<sub>14</sub>OH-Fettsäuren sind damit optimal im Hinblick auf die Toxizität des Moleküls<sup>19</sup>. Jede Abweichung von dieser Struktur reduziert die Endotoxizität. Strukturen ähnlich zu der von *E. coli*-Lipid A mit 2 Phosphaten, aber 7 oder 5 Fettsäuren sind etwa 100mal weniger toxisch aktiv. Eine Lipid A-Struktur mit nur einem Phosphat an 1- oder 4'-Position ist etwa 1000mal weniger aktiv als *E. coli*-Lipid A. Die Struktur, die die stärkste Endotoxizität entfaltet, ist aber nicht gleich der Struktur, die die beste Konstellation zur Bindung an die Wirtszelle zeigt. Dazu ist ein weniger strenges Raster erforderlich. Ein biphosphoryliertes Disaccharid zusammen mit einigen Fettsäuren (Minimum 2) binden optimal an die Wirtszelle; an die Anordnung gibt es dabei keine speziellen Anforderungen<sup>18</sup>.

Auch der Polysaccharidanteil besitzt eine Bedeutung für die Endotoxizität des LPS-Moleküls. Lipid A mit 2 Kdo-Resten besitzt eine höhere biologische Aktivität als isoliertes Lipid A, da diese Zucker die Konformation beeinflussen<sup>20-22</sup>.

Polysaccharide sind auch für die antigenen Eigenschaften, für die Löslichkeit von LPS, die Ladung, für die mitogenen Eigenschaften (die Stimulation von B-Zell-Untereinheiten) und die Aktivierung humaner Makrophagen-Zelllinien von Bedeutung<sup>19,22</sup>. Im LPS lässt sich eine innere und eine äußere Kernpolysaccharidregion unterscheiden. Die innere Kernpolysaccharidregion ist über eine  $\alpha$ -gebundene Kdo am Lipid A verankert und besteht aus den seltenen Zuckern Kdo und Heptose, an die teilweise weitere Substituenten binden. Die äußere Kernregion, die bei vielen gram-negativen Bakterien identisch ist, setzt sich aus Hexosezuckern wie Glukose, Galaktose, N-Acetyl-Galaktosaminen und N-Acetyl-Glukosaminen zusammen. Sie weist in der Struktur eine stärkere Variabilität auf als die innere Kernregion. Innere und äußere Kern-Zuckerreste können noch mit geladenen Gruppen substituiert sein<sup>18</sup>.

Das Haupt-Antigen, auf welches der Wirt mit der Produktion von Antikörpern reagiert, ist der O-Polysaccharidanteil von LPS. Dieser peripherste Teil des Moleküls besteht aus einer bis acht sich wiederholenden Einheiten von Glykosylresten und kommt nicht bei LOS (Lipo-Oligosaccharid) exprimierenden Bakterien und den rauen Mutationsformen von Bakterien vor. In diesem Teil variieren Bakterien am stärksten und bilden damit Hunderte von Serotypen und viele Untereinheiten. Der angeborene Teil des Immunsystems erkennt diese O-Polysaccharide und in der Folge wird Komplement aktiviert oder unterbunden. Bei der Einteilung der Stämme wird die Serologie der O-Antigene benutzt<sup>18</sup>.

Die biologische Aktivität von LPS ist auch abhängig von der räumlichen Struktur. Die Anwesenheit von Substituenten beeinflusst dabei die biologische Aktivität.<sup>19</sup>

### **2.2.1.2 LPS von *E. coli***

*Escherichia coli* (*E. coli*) ist einer der wichtigsten gastrointestinalen Kommensalen bei Säugetierspezies. So befinden sich große Mengen (im Gramm-Bereich) LPS im Gastrointestinaltrakt. Geringe Mengen diffundieren unter physiologischen Umständen in die portale Zirkulation und werden durch Kupffer-Zellen in der Leber über nicht stimulierende Abbauewege bewältigt. Gelangen Mengen, die die physiologische Diffusion übersteigen, in die Blutzirkulation, erfolgt eine systemisch-entzündliche Antwort des Immunsystems.

LPS aus *E. coli* kommt der Struktur, die den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR-4) am stärksten aktiviert, sehr nahe und besitzt somit ein hohes Potential, Monozyten/Makrophagen zu aktivieren. Es ist der potenteste Initiator von Monokinen, der derzeit bekannt ist und besitzt ein Hexa-Acyl diphosphoryliertes Lipid A. Fünf Acylketten haben die Länge C<sub>14</sub> sowie eine C<sub>12</sub> und sind asymmetrisch in 4+2 Konstellation an das Diglucosamid-Rückgrat gebunden. Eine Abweichung von dieser Struktur reduziert das endotoxische Potential stark<sup>18</sup>. Kernregion und O-Polysaccharidregion variieren in der Struktur zwischen den verschiedenen Stämmen.

## **2.2.2 LPS-vermittelte Effekte**

### **2.2.2.1 Allgemeine LPS-Effekte**

Hat ein Organismus Kontakt mit geringen Mengen an LPS, scheint dies einen immunstimulierenden Effekt zu haben<sup>23</sup>. Unterschreiten die Mengen eine bestimmte Dosis, so führen wiederholte Gaben eher zu einer Zunahme der TNF- $\alpha$ -Freisetzung bei isolierten Zellen

im Versuch<sup>24</sup>.

Große Mengen an LPS in der Blutbahn (schwere gram-negative Infektion, Absterben großer Mengen an Bakterien nach Antibiotikagabe, Übertritt größerer Mengen *Enterobacteriaceae* aus dem Darm) verursachen Fieber, Leukopenie, Tachykardie, Tachypnoe, Hypotension, disseminierte intravasale Koagulopathie und Multiorganversagen, was insgesamt als septisches Schocksyndrom bezeichnet wird<sup>25</sup>. Die vaskuläre Permeabilität steigt dabei an<sup>26</sup>. Auf molekularer Ebene wird nach LPS-Gabe eine Anzahl proinflammatorischer Mediatoren wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  freigesetzt<sup>18</sup>. Diese aktivieren Makrophagen<sup>27</sup> und Monozyten<sup>28</sup> zur Elimination von Pathogenen.

### 2.2.2.2 LPS-Effekte in der bovinen Milchdrüse

Zur Inokulation von LPS in die Euter laktierender Kühe gibt es zahlreiche Versuche, da dies sich zum Studium von Vorgängen während einer *E. coli*-Mastitis als geeignetes Modell erwiesen hat. Bereits 6h nach Inokulation von LPS ins Euter kommt es zu Veränderungen im Milchcharakter mit Flockenbildung. Bis 5h nach Inokulation zeigten alle Tiere einen Anstieg der Körpertemperatur, der bis 9h nach LPS-Inokulation anhielt. Insgesamt waren alle klinischen Veränderungen innerhalb von 72h reversibel<sup>29</sup>. Der Gehalt an Leukozyten im Blut nimmt ab und erreicht das Ausgangsniveau bereits wieder nach 12h<sup>30</sup>.

Durch den Influx von PMN ins Euter steigt nach der LPS-Inokulation der Gehalt an somatischen Zellen in der Milch (SCC, engl. somatic cell count) an. Die elektrische Leitfähigkeit und die Konzentration von Na<sup>+</sup>- und Cl<sup>-</sup>-Ionen nimmt signifikant zu, mit einem Peak bei 12h nach Inokulation<sup>31</sup>.

Inokulierte Euterviertel zeigen Schwellung; die Herzfrequenz kann ansteigen und der Appetit reduziert sein<sup>32</sup>.

Erhöhte TNF- $\alpha$  Werte in der Milch zeigen sich mit einem Höhepunkt bei 8h. Dagegen sind erhöhte Werte an TNF- $\alpha$  im Blut nicht festzustellen. Ein signifikanter Anstieg von Serum-Amyloid-A (SAA) konnte im Serum und in der Milch gemessen werden. Das Laktationsstadium spielt eine Rolle in der Ausprägung der Mastitis, wobei Kühe in der Früh-laktation tendenziell einen schwereren Verlauf zeigen<sup>33</sup>.

In mit LPS behandelten Eutern wurde eine signifikante Reduktion der Milch-Perchlorat-Konzentration gemessen, mit einer streng negativen Korrelation zur mammären vaskulären Permeabilität<sup>34</sup>.

Die Genexpression der Mehrheit der Entzündungsfaktoren, aber nicht aller, ist innerhalb von Stunden erhöht. Die erniedrigte Genexpression von  $\alpha$ -Laktalbumin und  $\kappa$ -Kasein kann die Milchleistung negativ beeinflussen<sup>35</sup>.

Die Expression immunrelevanter Gene wird größtenteils nach intramammärer LPS-Infusion gesteigert; der stärkste Anstieg konnte hierbei für das Chemokin CXCL5 gezeigt werden<sup>36</sup>. Auf Produktebene steigt die Konzentration von LBP (engl. lipopolysaccharide binding protein) im Plasma nach 8h an und erreicht maximale Werte nach 24h. Die LBP-Konzentration in der Milch steigt nach 12h an und erreicht ihr Maximum ebenfalls nach 24h<sup>37</sup>. Die Konzentrationen von löslichem CD14 entwickeln sich parallel zum SCC mit einem Peak bei 12h nach Inokulation und mit sinkenden Konzentrationen ab 24h. Die Konzentration an Interleukin-8 in der Milch steigt im inokulierten Viertel an. Benachbarte nicht inokulierte Viertel zeigen hierbei basale Werte<sup>38</sup>. Auf zirkulierenden PMN nimmt die Expression von CD62L ab und die Expression von CD11b und CD18 steigt an<sup>29</sup>, was zur Margination und

entzündungsgerichteten Migration führt.

## 2.3 Erregererkennung durch Komponenten des angeborenen Immunsystems

PAMPs werden durch Erreger-Erkennungsrezeptoren (PRRs, engl. pattern recognition receptors) erkannt, die auf Zellen des Immunsystems zu finden sind. Eine Untergruppe der PRRs, die Toll-like-Rezeptoren, spielen bei der Auslösung einer Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle.

### 2.3.1 Toll-like-Rezeptor (TLR) vermittelte Erkennung von *E. coli*

Ursprünglich wurden Toll-Rezeptoren bei der Fruchtfliege *Drosophila* identifiziert<sup>39</sup>. Sie dienen der spezifischen Erkennung von Pathogenen und der Aktivierung des konstitutiven Immunsystems. Homologe in Struktur und Gensequenz zu diesen Toll-Rezeptoren wurden auch bei Mensch und Maus entdeckt, so genannte Toll-like-Rezeptoren (TLRs). Bei Mensch und Maus konnten inzwischen mindestens 13 verschiedene TLRs identifiziert werden<sup>40</sup>.

Die spezifischen TLR-Liganden gehören alle zur Gruppe der PAMPs. Sie besitzen Strukturen mit höchst konserviertem Aufbau und kommen in einem sehr großen Spektrum von Mikroorganismen vor. Tabelle 1 zeigt die bei Mensch und Maus identifizierten TLRs, die dazugehörigen Liganden und die Herkunft der Liganden soweit bekannt.

**Tabelle 1: Toll-like-Rezeptoren und ihre Liganden (modifiziert nach Akira und Takeda [2004]<sup>41</sup>)**

| Rezeptor                | Ligand                       | Herkunft des Liganden                | Ref.  |
|-------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-------|
| TLR-1                   | Triacyl-Lipopeptide          | Bakterien und Mykobakterien          | 42    |
|                         | lösliche Faktoren            | <i>Neisseria meningitidis</i>        | 43    |
| TLR-2                   | Lipoprotein/Lipopeptide      | Verschiedenste bakterielle Pathogene | 44    |
|                         | Peptidoglykan                | Gram-positive Bakterien              | 45,46 |
|                         | Lipoteichonsäure             | Gram-positive Bakterien              | 46    |
|                         | Lipoarabinomannan            | Mykobakterien                        | 47    |
|                         | Phenol-lösliches Modulin     | <i>Staphylococcus epidermidis</i>    | 48    |
|                         | Glycoinositolphospholipide   | <i>Trypanosoma cruzi</i>             | 49    |
|                         | Glycolipide                  | <i>Treponema maltophilum</i>         | 50    |
|                         | Porine                       | <i>Neisseria</i>                     | 51    |
|                         | atypische Lipopolysaccharide | <i>Leptospira interrogans</i>        | 52    |
|                         | atypische Lipopolysaccharide | <i>Porphyromonas gingivalis</i>      | 53    |
|                         | Zyosan                       | Pilze                                | 54    |
| Hitze-Schock Protein 70 | Wirt                         | 55                                   |       |



|        |  |   |       |
|--------|--|---|-------|
| TLR-3  | doppelsträngige RNA                          | Viren   | 56    |
| TLR-4  | Lipopolysaccharide                           | Gram-negative Bakterien                                 | 57    |
|        | Taxol  | Pflanzen  | 58    |
|        | Fusion Protein                               | Respiratorisches Syncytialvirus                         | 59    |
|        | Envelope Protein                             | Maus Mammatumor Virus                                   | 60    |
|        | Hitze-Schock Protein 60                      | <i>Clamidia pneumoniae</i>                              | 61,62 |
|        | Hitze-Schock Protein 70                      | Wirt  | 63    |
|        | Typ III repeat extra domain A of fibronectin | Wirt  | 64    |
|        | Oligosaccharide der Hyaluronsäure            | Wirt  | 65    |
|        | Polysaccharidfragmente von Heparansulfat     | Wirt  | 66    |
| TLR-5  | Fibrinogen                                   | Wirt  | 67    |
|        | Flagellin                                    | Bakterien   | 68    |
| TLR-6  | Diacyl Lipopeptide                           | <i>Mycoplasma</i>                                       | 69    |
|        | Lipoteichonsäure                             | Gram-positive Bakterien                                 | 46    |
|        | Zymosan                                      | Pilze   | 70    |
| TLR-7  | Imidazoquinoline                             | synthetische Verbindung                                 | 71    |
|        | Loxoribine                                   | synthetische Verbindung                                 | 72    |
|        | Bropirimine                                  | synthetische Verbindung                                 | 72    |
|        | einzelsträngige RNA                          | Viren   | 73,74 |
| TLR-8  | Imidazoquinoline                             | synthetische Verbindung                                 | 75    |
|        | einzelsträngige RNA                          | Viren   | 73    |
| TLR-9  | CpG-enthaltende DNA                          | Bakterien und Viren                                     | 76    |
| TLR-10 | unbekannt                                    | unbekannt   |       |
| TLR-11 | unbekannt                                    | uropathogene Bakterien                                  | 77    |
|        |  | Profilin-ähnliches Protein von <i>Toxoplasma gondii</i> | 78    |
| TLR-12 | unbekannt                                    | unbekannt   | 40    |
| TLR-13 | unbekannt                                    | unbekannt   | 40    |

Neben den bei Säugetieren identifizierten TLRs wurden bei Reptilien, Fischen und

Amphibien noch eine ganze Reihe weiterer TLRs isoliert<sup>79</sup>.

### 2.3.2 TLR-4-Signalkaskade bei Bindung von LPS

Wie bereits beschrieben, wird LPS über TLR-4 erkannt. Es gilt im Rahmen der *E. coli*-Mastitis als der pathogene Bestandteil des Erregers, dem am meisten Bedeutung zugemessen wird. LPS bindet zuerst an CD14. Optimal wird dies durch die Anwesenheit von Lipopolysaccharid-Binding Protein (LBP) erreicht. LBP ist ein von Hepatozyten stammendes Akute-Phase-Protein. Durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-6 wird seine Expression hochreguliert<sup>80,81</sup>. Als Lipid-Transfermolekül dissoziiert es LPS-Aggregate in Monomere und katalysiert den Transfer von diesen Monomeren zu CD14. Es stabilisiert die Assoziation von LPS und CD14, indem es einen dreiteiligen Komplex formt. Der CD14-LPS-LBP-Komplex wird dem TLR-4-MD-2-Komplex präsentiert<sup>82</sup>. Experimentelle intramammäre Inokulation mit LPS induzierte in der Milch höhere Mengen an LBP<sup>37</sup>. Das Protein CD14 ist entscheidend für die Antwort auf LPS. Man findet es als eine über ein Glykosyl-Phosphatidylinositol-Ende membrangebundene Form, so genanntes mCD14, und als lösliche Form, so genanntes sCD14, in Plasma und Milch<sup>83</sup>. Monozytische Zellen und PMN exprimieren mCD14 und setzen sCD14 frei<sup>84-86</sup>. Epitheliale und endotheliale Zellen, die auf niedrige Konzentrationen von LPS nur in Anwesenheit von sCD14 reagieren, exprimieren auch mCD14 auf ihrer Oberfläche<sup>87-94</sup>. Humane und murine Milchdrüsenepithelzellen exprimieren CD14<sup>93,95</sup>, für bovine Milchdrüsenepithelzellen wurde dies anhand von Microarray-Experimenten gezeigt, bislang jedoch noch nicht publiziert (Günther et al., in Vorbereitung). Nach Inokulation von LPS oder verschiedenen Mastitispathogenen ins Euter erfolgt der Anstieg von sCD14 analog dem Anstieg der einwandernden PMN in der Milch<sup>4,37,38,96</sup>, was deren CD14-Freisetzung nahelegt<sup>97</sup>. CD14 wird ebenfalls für die Erkennung anderer Bakterienprodukte wie Lipoteichonsäure (LTA) und Lipoarabinomannan benötigt<sup>98-100</sup>. Die Freisetzung von sCD14 durch PMN verursacht gleichzeitig eine Herunterregulierung der IL-8-Freisetzung<sup>98,101</sup>. Herunterregulierung von IL-8 durch sCD14 scheint ein Mechanismus zur Kontrolle exzessiver Migration von PMN in die Milchdrüse zu sein<sup>14</sup>. Abbildung 1 zeigt die Signalkaskade, die ausgelöst wird, wenn LPS am TLR-4 bindet.

Die LPS-Erkennung durch TLR-4 und den assoziierten Proteinen MD-2 und CD14 führt zur Rekrutierung vom Adapterprotein myeloider Differenzierungsfaktor 88 (MyD88), an den intrazellulären Teil von TLR-4. Neueste Hinweise legen nahe, dass MyD88 direkt an das TIR-Domain-Containing Adapter Protein (TIRAP) bindet, auch bekannt als MyD88 adapterlike (MAL) Protein. MAL tritt direkt in Beziehung mit der TIR-Domäne von TLR-4<sup>102</sup>. In Abwesenheit von MyD88 erleichtert TIRAP den NF- $\kappa$ B-Signalweg auf einem MyD88-unabhängigen Weg<sup>103,104</sup>. Zusätzlich zur TIR-Domäne enthält MyD88 eine andere hochkonservierte Domäne, die so genannte Death Domain (DD). Diese erleichtert MyD88 mit anderen DD-enhaltenden Signalmolekülen einschließlich Interleukin 1(IL-1) Rezeptor assoziierter Kinase (IRAK)-4 zu interagieren<sup>105</sup>. Aktivierung der MyD88 erleichtert die Phosphorylierung von IRAK-1, die durch IRAK-4 vermittelt wird. Phosphoryliertes IRAK-1 interagiert mit Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-Rezeptor assoziiertem Faktor-6 (TRAF-6) und initiiert damit die Aktivierung einer Kinase-Kaskade einschließlich der I $\kappa$ B-Kinase (IKK)<sup>106-109</sup>. Aktivierung dieser Kaskade führt zur Phosphorylierung und Abbau des NF- $\kappa$ B-Inhibitors (I $\kappa$ B). Dadurch ist es NF- $\kappa$ B möglich, zum Kern zu gelangen und eine proinflammatorische Gen-Expression auszulösen.

LPS/TLR-4-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist nicht nur durch den Signalweg über TIRAP und MyD88 vermittelt. Auch ein anderes Signalmolekül, bekannt als TIR-Containing Adapter Molekül-2 (TICAM-2), auch bekannt unter TIR Domain-Containing Adaptor-Inducing IFN- $\beta$

Related Adapter Molekül (TRAM), wird nach der TLR-4 Aktivierung zur intrazellulären Domäne von TLR-4 rekrutiert<sup>110-112</sup>. TICAM-2 rekrutiert TICAM-1 (auch bekannt als TIR-Domain-Containing Adaptor-Inducing IFN- $\beta$  [TRIF]). TICAM-1 induziert die NF- $\kappa$ B-Aktivierung über TRAF-6 und/oder RIP-1 (engl. receptor-interacting-protein-1)<sup>113,114</sup>.

Zusätzlich zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B aktivieren TICAM-1 und -2 den IRF (engl. interferon-regulatory-factor)-3-Transkriptionsfaktor, der die IFN- $\beta$ -Produktion fördert<sup>115</sup>.

Ein großer Teil der durch LPS vermittelten destruktiven Wirkung im Gewebe wird durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B hervorgerufen<sup>116-119</sup>. Viele proinflammatorische Zytokine (wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ ) und Adhäsionsmoleküle, die die lokale oder systemische Antwort auf eine Mastitis durch gram-negative Bakterien vermitteln, werden NF- $\kappa$ B-abhängig durch LPS heraufreguliert<sup>120-124</sup>. Auch die Zytokinexpression bei Kühen mit Mastitis korreliert mit der NF- $\kappa$ B-Aktivierung<sup>125</sup>.

Daneben werden durch das TLR-4-Signal Aktivierungskaskaden in Bewegung gesetzt, die zum aktivierten Protein-1, zur mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) und zu p38 führen. Folge davon ist die Zellaktivierung und Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12), Sauerstoffradikalen, Stickoxid (NO), Gewebsfaktoren, sowie antiinflammatorischen Zytokinen, wie IL-10, und transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>14</sup>. Biologische Effekte sind vor allem durch TNF- $\alpha$  und IL-6 vermittelt. Diese werden durch mononukleäre Phagozyten produziert und sind am septischen Schock beteiligt<sup>126,127</sup>. Biologische Effekte werden vor allem durch IL-8 vermittelt, das ein potentes Chemokin für PMN darstellt<sup>15</sup>.

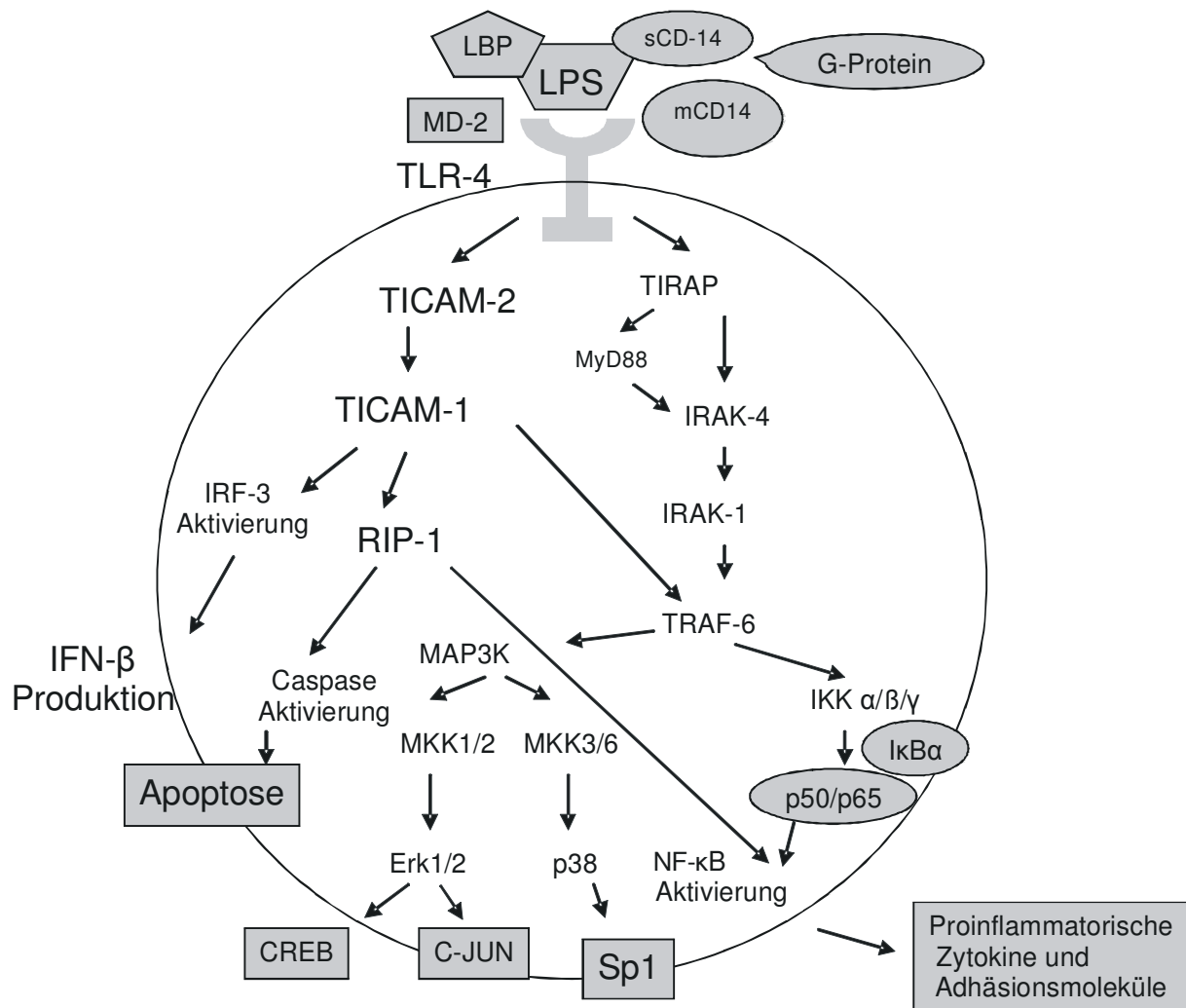
TLR-4 aktiviert auch proapoptotische Signale, die zum Zelltod führen können. Daran sind unter anderem MyD88, TIRAP, IRAK-1, TICAM-1, TICAM-2 und TRAF-6 beteiligt<sup>128-131</sup>. Es gibt Hinweise, dass diese Apoptose durch die Aktivierung von Caspase-8 durch das FAS-assoziierte Death Domain Protein (FADD) vermittelt werden kann<sup>131,132</sup>.

Die Erkennung von LPS geschieht nicht durch einen einzelnen Rezeptor, sondern durch ein Zusammenspiel von vielen Rezeptoren, die auf sogenannten Lipid-Rafts konzentriert sind<sup>133</sup>. Darunter versteht man periphere Ansammlungen von Lipiden, die bei der Rekrutierung und Konzentration von Signalmolekülen eine Rolle spielen<sup>134</sup>. Es wird das Vorhandensein weiterer Rezeptoren vermutet, denn CD14 blockierende Antikörper können die LPS-Bindung nur teilweise verhindern<sup>135-138</sup>.

Bei menschlichen Monozyten sind verschiedene LPS-Signalmoleküle wie CD14, hsp70 und hsp90 auf Lipid Rafts als feste Einrichtung vorhanden<sup>133,134</sup>. Andere wie TLR-4, CXCR4 und MyD88 werden durch LPS-Stimulierung rekrutiert<sup>139,133,140</sup>. An diesen Mikrodomänen werden Rezeptormoleküle nah zusammengebracht, um die Protein-Protein-Interaktion und damit die Signalgebung zu erleichtern<sup>141</sup>. Abhängig vom Typ des Pathogens und vom angegriffenen Zelltyp werden verschiedene supramolekuläre Aktivierungsmuster von verschiedenen Rezeptoren geformt. Dies führt zu einer signal- und genspezifischen Aktivierung oder Repression von Transkriptionsantworten<sup>142,82</sup>.

Gram-negative Bakterien im Euter setzen LPS frei. In einer darauf folgenden proinflammatorischen Reaktion spielen PMN eine zentrale Rolle als Effektorzellen<sup>143</sup>. LPS erhöht die Aktivität und die funktionelle Lebensdauer von PMN, indem sie die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies erhöht<sup>144,145</sup> und die Apoptose (als wirtsschonenden Zelltod) verhindert<sup>146</sup>. Alves-Filho et al. (2006) zeigten, dass bei TLR-4-Wild-Typ-Mäusen die Injektion von LPS oder Gram-negativen Bakterien die PMN-Migration erhöht, während dies bei TLR-4-defizienten Mäusen nicht der Fall ist<sup>147</sup>. Daraus kann man schließen, dass der

große Influx von aktivierten PMN ins Euter ein TLR-4-abhängiger Prozess zu sein scheint<sup>14</sup>.



**Abbildung 1: LPS-Signaltransduktion (modifiziert nach Cavailon und Adib-Conquy [2006]<sup>148</sup>)**

### 2.3.3 Regulierung der TLR-4-Expression

In den letzten Jahren wurden die bovinen TLRs und TLR-4-induzierte Gene mit Beteiligung an der Signalkaskade zur NF-κB-Aktivierung geklont, sequenziert und kartiert<sup>149-153</sup>. Unter den Molekülen, die in die intrazelluläre TLR-4-Signalkaskade involviert sind, liegt die Aminosäuren-Homologie zwischen Kuh und Mensch bei 60-92%.

Verglichen mit den humanen Orthologen sind die funktionalen Domänen (wie Death Domain Regionen) innerhalb der bovinen translatierten Sequenzen von jedem Gen hoch konserviert. Dies legt die funktionale Gleichheit nahe. Einzelne Variationen in der Aminosäurenabfolge sollen die Funktionalität beeinträchtigen<sup>104,143,154,155</sup>. Ob Unterschiede in der Aminosäurenabfolge bei den bovinen TLR-4-Signalmolekülen deren Funktionen beeinflussen, ist unbekannt<sup>14</sup>.

Zur Genexpression der TLRs bei der bovinen Mastitis gibt es Untersuchungen aus Feldstudien wie auch aus experimentellen Ansätzen: Goldammer et al. (2004)<sup>156</sup> und Petzl et al. (2008)<sup>157</sup> berichten über eine erhöhte Expression von TLR-4- und TLR-2-mRNA im

Eutergewebe *E. coli*-infizierter Kühe. Auch kürzlich veröffentlichte *in vitro*-Daten zeigen die Induzierbarkeit boviner TLRs und nachgeschalteter Moleküle in der Milchdrüsenepithelzelle<sup>158,159</sup>.

TLR-4 wird bei humanen Monozyten sowohl auf der Plasmamembran als auch im Golgiapparat gefunden und kann zwischen diesen beiden Orten pendeln<sup>139</sup>. MD-2 soll dabei eine entscheidende Rolle spielen<sup>160,161</sup>. Der Transport zum Golgiapparat ist allerdings nicht zwingend notwendig, da eine Ausschaltung des Golgiapparats die TLR-vermittelte LPS-Signalkaskade nicht unterbindet. Die LPS-Signalkaskade wird dadurch angestoßen, dass TLR-4 an einen immobilisierten Antikörper bindet (wenn weder Internalisierung noch Verkehr zum Golgiapparat möglich sind). MyD88 wandert dann zur Oberfläche der Zelle<sup>139</sup>. Es wird diskutiert, dass der TLR-4-Pool im Golgiapparat einen Steady-state-Pool darstellt und durch die Migration von und zur Plasmamembran die Oberflächenexpression des TLR-4 reguliert<sup>14</sup>. Dies ist nur möglich, wenn Zellen auch TLR-4 auf der Oberfläche exprimieren<sup>139</sup>.

Es gibt Hinweise, dass Rinder sensibler auf LPS reagieren als Mensch und Maus<sup>3,162,163</sup>. Auch gibt es Unterschiede bei den intrazellulären Signalmolekülen, die bei der TLR-4-vermittelten NF- $\kappa$ B-Aktivierung involviert sind. Bovine Endothelzellen sind direkt sensitiv für die Apoptose-induzierenden Effekte von LPS. Humane Endothelzellen sind resistent, wenn sie nicht vorsensibilisiert werden mit mRNA- oder Protein-Synthese-Inhibitoren, Aktinomycin-D oder Cloheximid<sup>3,87,163-166</sup>.

Relativ zum humanen, fehlt bovinem FADD die Möglichkeit, TLR-4 induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung herunterzuregulieren<sup>129,152</sup>.

## 2.4 Endotoxintoleranz

### 2.4.1 Klinische Beobachtungen

Unter dem Phänomen, das auch als „LPS-Reprogrammierung“<sup>167</sup>, „Discordant Adaptation“ oder „LPS-Priming“ bezeichnet wird, versteht man, dass Zellen bzw. Patienten auf die wiederholte Gabe von LPS in geringerem Maße reagieren, als auf die erste Gabe. Dieser Gewöhnungseffekt beschränkt sich nicht allein auf Endotoxin von gram-negativen Bakterien, sondern tritt auch bei anderen PAMPs auf, wie Peptidoglycan<sup>168</sup>, Lipoarabinomannan<sup>169,170</sup>, Lipoteichonsäure<sup>171</sup> und Muramyldipeptid<sup>168</sup>. Diese Beobachtung ist seit vielen Jahrzehnten bekannt. Beeson berichtete schon 1947, dass es eine progressive Reduktion in der Fieberantwort von Kaninchen gibt, die wiederholt eine intravenöse Injektion mit typhoidem bakteriellen Pyrogen erhalten haben<sup>172</sup>. Er berichtete auch, dass diese Toleranz auf bakterielles Pyrogen merklich vermindert ist, wenn das retikulo-endotheliale System blockiert wird. Tolerante Tiere eliminierten die bakteriellen Substanzen schneller. In den Jahren 1949-1950 zeigten Heyman et al. und Neva et al., dass Patienten, die sich von typhoidem oder paratyphoidem Fieber<sup>173</sup> erholt hatten und Patienten nach Malaria<sup>174</sup> signifikant weniger auf eine Injektion mit LPS reagierten als gesunde Patienten ohne Vorerkrankung. In den 60er Jahren des vorigen Jahrhunderts wurden die gleichen Ergebnisse bei Patienten beobachtet, die sich von einer *Salmonella typhi*-Infektion oder von einem *Plasmodium*-infizierten Mosquito-Biß erholt hatten, bevor sie eine Injektion mit LPS erhielten<sup>175</sup>. Ähnliches, nämlich eine reduzierte Fieberantwort, wurde auch von Patienten mit Pyelonephritis und Infektionen des Harntrakts berichtet<sup>175</sup>. Durch Vorbehandlung mit LPS konnte die Überlebensrate von Mäusen mit disseminierter *Cryptococcus neoformans* Infektion<sup>176</sup> erhöht werden und die Pilzbürde im Gewebe reduzierte sich. Die maximale Verminderungen der Immunantwort wurde einige Tage nach der initialen Injektion beobachtet.

## 2.4.2 Molekulare Grundlagen der Endotoxintoleranz

Die *in vivo* seit langem beobachtete Tatsache, dass vorhergehende Infektionen einen gewissen Schutz gegen folgende letale Dosen an LPS bieten, wurde in *in vitro*-Versuchen an isolierten Zellen bestätigt<sup>5</sup>. Studien mit LPS zeigten bei vorbehandelten Phagozyten eine erhöhte Superoxid-Anionen-Produktion und eine erhöhte Phagozytose von *Candida albicans*<sup>177</sup>. Zellen mit LPS-Toleranz zeigten eine verminderte Zytokin-Antwort und eine erhöhte Resistenz gegenüber Infektionen mit gram-negativen Bakterien, die vor allem durch eine modifizierte angeborene Immuneffektorfunktion verursacht wird<sup>178</sup>. Eine Übersicht zur Expression von Entzündungsmediatoren im Modell ist in Tabelle 2 dargestellt.

Wie oben ausführlich beschrieben initiiert LPS zahlreiche Signalkaskaden in naiven Makrophagen. Einige Schritte in den Schlüssel-Pfaden werden unter Endotoxintoleranz herunterreguliert.

Endotoxintoleranz resultiert in einer veränderten G-Protein-Kupplung<sup>179</sup>, erhöhte CD14-Expression<sup>180</sup> auf der Zelloberfläche und einer verminderten NF- $\kappa$ B Aktivierung<sup>180</sup>. Endotoxintoleranz induziert CD-14 abhängige Signaländerungen im G- $\alpha$ -i-gekoppelten Pfad, was zur MAPK-Aktivierung führt. Ebenso führt Endotoxintoleranz in einem G- $\alpha$ -i unabhängigen Pfad zur Verminderung des Inhibitors der TNF- $\alpha$ -Translokation I $\kappa$ -B $\alpha$ <sup>181</sup>.

**Tabelle 2: Modulierte Entzündungsmediatoren bei naiven und endotoxintoleranten Tieren und naiven und endotoxintoleranten Zellen im *in vivo*- und *in vitro*-Modell (modifiziert nach West [2002]<sup>5</sup>)**

| Mediator          | Naive Antwort | Endotoxintolerante Antwort | Experiment      | Referenzen      |
|-------------------|---------------|----------------------------|-----------------|-----------------|
| Serum TNF         | erhöht        | vermindert                 | <i>in vivo</i>  | 182-185         |
| TNF               | erhöht        | vermindert                 | <i>in vitro</i> | 167,169,186-193 |
| IL-1              | erhöht        | erhöht                     | <i>in vivo</i>  | 183-185         |
|                   |               | vermindert                 | <i>in vivo</i>  | 194             |
| IL-1              | erhöht        | erhöht                     | <i>in vitro</i> | 195,196,197     |
|                   |               | vermindert                 | <i>in vitro</i> | 198             |
| IL-6              | erhöht        | vermindert                 | <i>in vivo</i>  | 177,199,200     |
| IL-6              | erhöht        | erhöht                     | <i>in vitro</i> | 195             |
| Nitrat/Nitrit     | erhöht        | stärker erhöht             | <i>in vitro</i> | 167,203         |
| PGE2 <sup>b</sup> | erhöht        | stärker erhöht             | <i>in vitro</i> | 179,195,196     |
| TXB2 <sup>c</sup> | erhöht        | vermindert                 | <i>in vitro</i> | 204,205         |
| IL-8              | erhöht        | stärker erhöht             | <i>in vitro</i> | 206,207         |
|                   |               | vermindert                 | <i>in vitro</i> | 208             |

Bei endotoxintoleranten Makrophagen ist die LPS-stimulierte Tyrosin-Phosphorylierung von

40- bis 45-kDa-Proteinen unterdrückt<sup>187</sup>. Diese Proteine korrespondieren mit zwei Mitgliedern der MAPK-Familie, ERK und p38 Kinase. Zusätzlich war die LPS-induzierte Phosphorylierung von c-Jun NH<sub>2</sub>-terminalen Kinasen (JNK), einem Mitglied der MAPK-Familie, bei toleranten Makrophagen vermindert<sup>187</sup>.

Die Aktivierung von Raf-1, das ein Teil der ERK-Kaskade ist, wird durch Endotoxintoleranz gehemmt<sup>187</sup>. Die Expression der COX-2-mRNA und zu einem geringeren Ausmaß der TNF- $\alpha$ -mRNA scheint dabei teilweise herunterreguliert zu werden. Die Phosphatase-Aktivität könnte unter Endotoxintoleranz verändert sein. So wurde für den Phosphataseinhibitor Okadeinsäure gezeigt, dass die TNF-Synthese und Expression von COX-2 sowie TNF-mRNA bei endotoxintoleranten Zellen induziert werden konnte<sup>190</sup>. Weiterhin ist die Phosphorylierung der extrazellulären signalregulierten Kinasen (ERK1/2), JNK und der p38-Kinase bei endotoxintoleranten murinen Makrophagen vermindert<sup>169</sup>. In Tabelle 3 sind die Signaltransduktionseffekte der LPS-Stimulation von Makrophagen zusammengefasst.

Änderungen in der Zellantwort scheinen sekundärer Natur zu sein und werden als eine Folge von Veränderungen im Signaltransduktionspfad angesehen<sup>179,180,209,210</sup>.

**Tabelle 3: Signaltransduktionseffekte der Lipopolysaccharidstimulation bei naiven und endotoxintoleranten Makrophagen *in vitro* (modifiziert nach West [2002]<sup>5</sup>)**

| Mediator               | Naive Antwort  | Endotoxintolerante Antwort | Referenzen          |
|------------------------|----------------|----------------------------|---------------------|
| ERK                    | erhöht         | gehemmt                    | 187,189,211-213     |
| SAPK                   | erhöht         | gehemmt                    | 187,214             |
| p38 Kinase             | erhöht         | gehemmt                    | 169,181,214,215     |
| IRAK                   | erhöht         | gehemmt                    | 108                 |
| MyD88                  | erhöht         | gehemmt                    | 108,216             |
| TLR-4                  | keine Änderung | gehemmt                    | 211,216             |
| NF- $\kappa$ B         | erhöht         | gehemmt                    | 169,211,217-220     |
| I $\kappa$ -B $\alpha$ | gehemmt        | erhöht                     | 181,211,218,221-223 |

In den letzten Jahren wurden zahlreiche intrazelluläre Moleküle entdeckt, die LPS-aktivierte Signalwege herunterregulieren<sup>5</sup>.

Zur Erklärung des genauen Mechanismus wird es letztlich noch einiger Forschungsarbeit bedürfen, wengleich mittlerweile sehr viele Einzelheiten über die Veränderungen auf molekularer Ebene unter dem Phänomen der Endotoxintoleranz bekannt sind.

### 2.4.3 Regulation des TLR-assozierten Signalweges

#### 2.4.3.1 Desensibilisierende Liganden im Plasma

Sera von Sepsispatienten können die TNF-Produktion der aktivierten Monozyten von gesunden Spendern herunterregulieren<sup>224</sup>. Dieser immunsuppressive Effekt wird signifikant reduziert, wenn das Plasma gefiltert wurde und wenn es mit anti-IL-10-Antikörpern inkubiert

wurde<sup>225</sup>.

IL-10 ist ein bedeutender funktioneller Deaktivator von Monozyten in menschlichem Plasma von Patienten mit septischem Schock.

Manche Aspekte der Endotoxintoleranz können über die Wirkung von IL-10 erklärt werden, jedoch nicht die gesamte Dysregulation bei septischen Patienten<sup>226</sup>. IL-10-Knock-Out-Mäuse können beispielsweise auch eine Endotoxintoleranz entwickeln<sup>227</sup>.

Für TGF- $\beta$  wurde auch im Tiermodell bei septischen Patienten bewiesen, dass es die Immunantwort von Splenozyten unterdrücken kann<sup>228</sup>. TGF- $\beta$  aus apoptotischen T-Zellen trägt zu diesem Milieu bei<sup>229</sup>.

Es gibt Hinweise für eine starke Interaktion zwischen Komponenten des Nervensystems und des Immunsystems. Zahlreiche Neuromediatoren fungieren als Immunsuppressoren: So steigt die Konzentration von Catecholaminen in Stresssituationen. Sie unterdrücken die Aktivität immunkompetenter Zellen, verhindern die TNF-Produktion und unterstützen die IL-10-Freisetzung<sup>230</sup>.

Das  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierende Hormon induziert die IL-10-Produktion bei menschlichen Monozyten<sup>231</sup>.

Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) und hypophysäre Adenylatcyclase aktivierendes Polypeptid unterdrücken direkt die Endotoxin-induzierte proinflammatorische Zytokinsekretion<sup>232</sup>.

Septische Zustände aktivieren die Hypothalamus-Hypophyse-Nebennieren-Achse, was die Freisetzung von Glukokortikoiden<sup>233</sup>, Prostaglandinen<sup>234</sup> und zirkulierenden Hitze-Schock Proteinen<sup>235</sup> bewirkt. Diese sind in der Lage, die Freisetzung von Zytokinen zu beschränken und können somit auch einen Beitrag zur Desensibilisierung von zirkulierenden Zellen leisten.

#### **2.4.3.2 Endotoxin-neutralisierende Moleküle im Plasma**

Lösliches CD14 und LBP sind bei SIRS-(Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom)-Patienten im Plasma erhöht und unterdrücken die LPS-induzierte TNF-Produktion durch schnelle Neutralisation von LPS<sup>148</sup>.

#### **2.4.3.3 NF- $\kappa$ B-Inhibition**

Bei humanen Mono-Mac-6-Zellen veränderte die Endotoxintoleranz signifikant die NF- $\kappa$ B-Aktivierung. NF- $\kappa$ B ist entscheidend für die Expression vieler Zytokine, die bei der Pathogenese der Entzündung beteiligt sind. Durch eine Gruppe von Inhibitorproteinen (IkB) wird es aktiviert und reguliert. Endotoxintolerante Zellen haben eine Veränderung in der Zusammensetzung der Untereinheiten von NF- $\kappa$ B. Es kommen mehr p50-Homodimere vor als p50p65-Heterodimere, die normalerweise bei naiven Zellen zu finden sind. Diese Veränderung der Zusammensetzung der Untereinheiten vermindert die Fähigkeit dieser Zellen, mRNA von proinflammatorischen Zytokinen zu transkribieren.

Blackwell et al. (1997) fanden in einer Studie heraus, dass Endotoxintoleranz mit einer verminderten Aktivierung von NF- $\kappa$ B und einer Verminderung der Anzahl der p65- wie auch der p50-Formen assoziiert war<sup>221</sup>.

Untersuchungen von Ziegler-Heitbrock et al. (1994) ergaben unter Endotoxintoleranz eine



Zunahme des Anteils des inaktiven p50-Homodimers von NF- $\kappa$ B und eine Abnahme des Anteils des aktiven p50p65-Heterodimers<sup>180</sup>.

Adib-Conquy et al. (2000) zeigten bei *in vitro*-Versuchen durch Stimulation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs) mit LPS eine niedrige Expression der p65p50- und der p50p50-Formen bei Sepsisüberlebenden, bei Nichtüberlebenden hingegen eine Dominanz der inaktiven p50-homodimeren Form sowie ein niedriges p65p50/p50p50-Verhältnis. Ebenfalls wurde in der Gruppe der Nichtüberlebenden eine reverse Korrelation zwischen dem Plasmaspiegel von IL-10 und dem p65p50/p50p50-Verhältnis gefunden. Niedrige Konzentrationen des Inhibitors I $\kappa$ -B $\alpha$  im Plasma der PBMCs liessen darauf schließen, dass nicht er die geringe Expression von NF- $\kappa$ B verursacht hatte<sup>236,237</sup>.

#### 2.4.3.4 Herunterregulierung des TLR-assoziierten Signalpfades

Die IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase (IRAK), ein wichtiger Schlüsselfaktor in der proximalen Signalvermittlung im LPS-abhängigen Signalweg, ist vermutlich durch Herunterregulation an der Entwicklung einer Endotoxintoleranz beteiligt<sup>5</sup>. Sie ist bei LPS-toleranten THP-1-Zellen reduziert<sup>108</sup>, wurde durch wiederholte LPS Exposition bei toleranten Zellen nicht aktiviert und ging keine Verbindung mit MyD88 ein<sup>108</sup>. IRAK-M verhindert die Dissoziation von IRAK-1 und IRAK-4 von MyD88 und die Formierung des TRAF6-Komplexes. Somit reguliert es den TLR-Signalpfad negativ. IRAK-M-defiziente Mäuse haben eine signifikant reduzierte Endotoxintoleranz<sup>238</sup>. Berichtet wird, dass Monozyten von Sepsispatienten, die *ex vivo* mit LPS stimuliert wurden, IRAK-M-mRNA schneller exprimierten als Zellen von gesunden Spendern<sup>239</sup>.

Phosphatidylinositol 3-Kinase ist ein früher Inhibitor des TLR-Signalpfades<sup>240</sup>. Bei septischen Patienten soll eine Änderung im IRAK-abhängigen Signalweg und ein beibehaltener effizienter Phosphatidylinositol 3-Kinase-abhängiger Signalweg mit einer Unterdrückung der Produktion von IL-1 $\beta$  verbunden sein und die sezernierte Form von IL-1RA (interleukin-1 receptor antagonist) als Antwort auf LPS selektiv erhöht sein<sup>241</sup>.

MyD88s könnte eine Rolle bei der Endotoxintoleranz spielen. MyD88s ist eine Splice-Variante von MyD88 und hat eine antagonistische Aktivität zum TLR-4-Signalpfad, indem es die IRAK-Phosphorylierung induziert. MyD88s wird unter Bedingungen einer chronischen Entzündung oder nach längerer Exposition durch LPS-Aktivierung exprimiert<sup>242</sup>.

Bei Monozyten von Sepsispatienten war die mRNA-Expression von TOLLIP (toll interacting protein) und SOCS-1 (suppressor of cytokine signalling-1) unverändert, hingegen die von MyD88s und von SIGIRR (single immunoglobuline IL-1R-related molecule) signifikant erhöht, verglichen mit Monozyten von gesunden Spendern<sup>243</sup>. TOLLIP ist ein Adapter-Protein, das mit der zytoplasmatischen TIR-Domäne von IL-1R, TLR-2 und TLR-4 assoziiert. Dieses kann die Aktivität von IRAK nach einer TLR-Aktivierung unterdrücken<sup>244</sup>. SIGIRR ist ein Mitglied der TLR/IL-1R Superfamilie. Es ist ein negativer Modulator der durch IL-1- oder TLR-4-Liganden induzierten Signalpfade bei anderen Zellen als Makrophagen<sup>245</sup>. SOCS-1 wird durch LPS-Stimulierung bei Makrophagen prompt induziert. Es ist ein negatives Regulatormolekül der JAK-STAT-Kaskade. Bei SOCS-1 defizienten Mäusen kann keine Endotoxintoleranz ausgelöst werden<sup>246</sup>.

Zusätzlich wird berichtet, dass die TLR-4-Oberflächenexpression unter Bedingungen der Endotoxintoleranz bei murinen Makrophagen herunterreguliert wird<sup>216,247</sup>. Bereits nach einer Stunde war TLR-4 herunterreguliert und blieb über 24h erniedrigt. Die toleranten Makrophagen zeigten eine erniedrigte Produktion inflammatorischer Zytokine, die mit der

Herunterregulation der TLR-4s korrelierte<sup>216</sup>.

Als Hinweis auf einen anderen zellulären Mechanismus wird eine alternativ gesplizierte Form von TLR-4 beschrieben. Sie wird mTLR-4 (alternatively spliced mouse TLR-4) bei Mäusen<sup>248</sup> und sTLR-4 (soluble TLR-4) bei Menschen<sup>151</sup> genannt. Diese Form ist löslich und es fehlt die intrazelluläre und transmembranale Domäne. Löslicher TLR-4 neutralisiert eine LPS-induzierte Entzündungsreaktion bei TLR-4-exprimierenden Zellen und verhindert eine exzessive LPS-Antwort<sup>248</sup>. Dies legt nahe, dass TLR-4 durch alternatives Splicing in verschiedene Spezies funktionell reguliert sein könnte.

Weitere Moleküle, die an der Herunterregulierung der TLR-4-induzierten MyD88-abhängigen Signalpfade beteiligt sind, sind in der Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4: An der Herunterregulierung der TLR-4-induzierten MyD88-abhängigen Signalpfade beteiligte Moleküle**

| Molekül              | Wirkweise   | Ref. |
|----------------------|---|------|
| RP105                | verhindert TLR-4/MD2-Aktivierung  | 249  |
| ST2                  | interagiert und inhibiert MyD88 und MAL/TIRAP   | 250  |
| Triad3A              | fördert die Ubiquitylation von TLR-4 und unterstützt den Abbau über die Proteosomen   | 251  |
| Flightless I homolog | interagiert mit MyD88, interferiert mit der Formation des TLR-4-MyD88-Komplex   | 252  |
| Monarch-1            | assoziiert mit IRAK-1, Blockade der IRAK-1 Hyperphosphorylierung ist die Folge  | 253  |
| A20                  | entfernt Ubiquitin-Teile vom Signalmolekül TRAF6  | 254  |
| SHIP                 | wird produziert als Antwort auf TGF $\beta$ , inhibiert über Hydrolyse der Phosphatidylinositol 3-Kinasen   | 255  |
| TRAF4                | interagiert mit und wirkt TRAF6 und TRIF-Molekülen entgegen   | 256  |
| FLN29                | enthält ein TRAF-6-bezogenes Zinkfinger-Motiv, das NF- $\kappa$ B und die mitogenaktivierte Proteinkinase-Aktivierung in der Signalkaskade nach TRAF6 unterdrückt | 257  |
| ABIN-3               | verhindert die NF- $\kappa$ B-Aktivierung, in der Signalkaskade nach TRAF6 aber vor IKK   | 148  |
| Dok-1, Dok-2         | negative Regulatoren des Ras-Erk-Signalweges  | 258  |
| DUSP1                | kontrolliert p38 MAP-Kinase-Aktivierung   | 259  |
| MKP-1                | kontrolliert p38 MAP-Kinase-Aktivierung   | 260  |
| RanGTPase            | reduziert NF- $\kappa$ B-Akkumulierung im Kern  | 261  |
| Bcl-3                | induziert durch IL-10, inhibiert die NF- $\kappa$ B-Bindung an seine Promotorstelle   | 262  |

#### 2.4.4 Aufhebung des endotoxintoleranten Zustandes

Die Kenntnisse zur Aufhebung der Endotoxintoleranz und zur Wiederherstellung der Abwehr sind rar<sup>263,264</sup>. Die Dauer des toleranten Stadiums variiert, wohl abhängig von Faktoren wie der Art des Pathogens und dem Immunstatus des Patienten. Sie reicht von wenigen Tagen bei Kindern mit *Haemophilus influenzae* Typ B-Meningitis<sup>265</sup> bis zu mehreren Wochen bei erfolgreich behandelten Sepsispatienten, deren periphere Blutleukozyten auf eine erneute Gabe von LPS verändert reagierten<sup>266</sup>. Die Erholung vom toleranten Stadium benötigt Acyloxyacyl-Hydrolase (AOAH), eine Lipase aus Makrophagen, dendritischen Zellen und PMN, die LPS durch Abspaltung von sekundären Fettsäureresten vom Lipid A-Teil inaktiviert<sup>267</sup>. Die Dauer und das Ausmaß der Toleranz *in vivo* korreliert mit der Präsenz von vollständig acyliertem LPS in peritonealen Makrophagen. Damit das tolerante Stadium wieder aufgehoben wird, müssen nicht nur die Bakterien abgetötet, sondern auch das LPS abgebaut sein<sup>268</sup>. Wild-Typ-Mäuse erlangen die ursprüngliche Immunreaktivität nach einer intraperitonealen LPS-Gabe nach 14 Tagen wieder. AOAH-defiziente Mäuse zeigen mindestens 3 Wochen lang eine reduzierte proinflammatorische Antwort auf eine zweite LPS-Gabe<sup>268</sup>.

Die Acyloxyacyl-Hydrolase-Aktivität ist bei zirkulierenden PMN entscheidend für die Detoxifizierung von LPS<sup>269,270</sup>.

#### 2.4.5 Immunmodulation mittels TLR-4-Agonisten

Seit längerer Zeit existiert der Ansatz, Mechanismen der angeborenen Abwehr gegen *E. coli* durch eine Art Vakzine zu stärken. Versuche dazu wurden mit LPS als intrauterinem Immunmodulator unternommen, um den klinischen Verlauf von Endometritiden bei Rindern zu verbessern<sup>271</sup>. Hierbei wurde vor allem der lokale Gehalt an PMN erhöht. Als eine unerwünschte Nebenwirkungen wurden jedoch Fieber und die lokale Entzündungsreaktion genannt<sup>272</sup>.

Eine andere Möglichkeit stellen TLR-4-Agonisten dar, die auf der einen Seite die LPS-Struktur nachahmen und analog in der Lage sind, das angeborene Immunsystem zu aktivieren. Auf der anderen Seite verfügen sie aber nicht über die gleiche Toxizität<sup>14</sup>: Monophosphoryl-A (MLA) wurde als eine nicht-toxische Variante der Lipid A-Fraktion von LPS entwickelt<sup>273</sup>. LPS und MLA induzieren die gleichen Zytokin-Profile. MLA ist jedoch 100fach weniger toxisch<sup>274</sup>.

Aminoalkyl-Glukosaminid-Phosphat (AGP) stellt einen weiteren synthetischen TLR-Agonisten dar. Es gehört zur Familie der Lipid A-Mimetika. Es konnte gezeigt werden, dass es TLR-4 abhängig eine Antwort des angeborenen Immunsystems erzeugt. Eine intranasal gesetzte Infektion mit Influenza-Virus ergab bei mit AGP vorbehandelten Wild-Typ-Mäusen, eine 70%ige Überlebensrate. Bei C3H/HeJ TLR-4-defizienten Mäusen hingegen war die Überlebensrate deutlich geringer<sup>274</sup>. Mikroarray-Ergebnisse zeigten, dass die TLR-4-Agonisten die Genexpression von Zytokinen wie IL-6 und TNF- $\alpha$  klar erhöhten. Die Transkription von NF- $\kappa$ B war bei menschlichen Makrophagen erhöht, wenn sie über 6h mit AGP stimuliert wurden<sup>275</sup>. In zahlreichen präklinischen und klinischen Studien wurde gezeigt, dass MLA und AGP potente, nicht toxische Vakzine-Adjuvantien sind<sup>276</sup>. Beide Agonisten stimulieren die Produktion von löslichen Mediatoren, einschließlich der von Zytokinen und Chemokinen<sup>147</sup>.

Vor dem Hintergrund der Frage, ob eine lokale oder systemische Applikation von LPS die gewünschte Endotoxintoleranz induziert, wurden Versuche an Mäusen durchgeführt: Hierzu

wurden TLR-4-Knock-Out-Mäuse eingesetzt, die mit TLR-4-exprimierenden Leukozyten (Endothelzellen sind TLR-4-negativ und PMN sind TLR-4-positiv) transfiziert waren und TLR-4-Wild-Typ-Mäuse, die mit TLR-4-Knock-Out-Leukozyten (Endothelzellen sind TLR-4-positiv und PMN sind TLR-4-negativ) transfiziert waren<sup>277</sup>. Nach LPS-Stimulation zeigte sich, dass die TLR-4-Expression auf PMN nicht notwendig war, damit sie in die Lunge einwandern konnten. Die Aktivierung des Lungenendothels war jedoch abhängig von der endothelialen TLR-4-Expression. Eine Erhöhung der TLR-4-Expression auf PMN wäre in diesem Zusammenhang nachteilig, da hierdurch der Leukozyten-Rolling-Mechanismus herunterreguliert werden würde und somit die Transmigration ins periphere Gewebe herabgesetzt wäre<sup>278</sup>.

Als ein weiterer Ansatz zur Erzeugung der Endotoxintoleranz ist die Anwendung TLR-4-spezifischer monoklonaler Antikörper hypothetisiert worden, die in Abwesenheit von LPS Zellen über MD-2-TLR-4 stimulieren<sup>279</sup>.

Nach Untersuchungen von Alves-Filho et al. (2006) sind TLR-4-Agonisten in Fällen von Infektionen mit gram-negativen Bakterien nützlich, können aber in Fällen von polymikrobiellen Infektionen tödlich sein<sup>280,281</sup>. Diese Resultate legen nahe, dass der Grat zwischen Steigerung der angeborenen Immunantwort und der Vorbeugung des septischen Schocks sehr schmal ist. Eine Überdosis an Endotoxin kann zudem einen schweren Schock auslösen<sup>272</sup>. So könnte die Gabe von TLR-4 Agonisten nur vorbeugender Natur sein. Werden sie jedoch während eines Entzündungsgeschehens eingesetzt, kann die Hochregulation von TLR-4 einen schweren septischen Schock auslösen. TLR-4-bindende LPS-Antagonisten werden z.B. in der Behandlung des septischen Schocks eingesetzt<sup>282,283</sup>.

#### 2.4.6 Experimente an Wiederkäuern

Maas und Colditz untersuchten bereits 1987 den Mechanismus der Endotoxintoleranz im naiven Schafeuter<sup>284</sup>: Sie applizierten Endotoxin von *E. coli* verdünnt in pyrogenfreier physiologischer NaCl-Lösung über den Strichkanal in nichtlaktierende oder laktierende Euter von multiparen Merinoschafen in der Mittel- bis Spätlaktation. Anschließend wurde der Zellgehalt in der Milch bestimmt. In nichtlaktierenden Eutern wurde folgendermaßen vorgegangen: Eine Euterhälfte wurde an drei Tagen sechsmal mit 1µg LPS in 1ml 0,9%iger NaCl-Lösung infundiert. Danach wurden die Euter ausgespült und eine 7. LPS-Infusion in beide Euterhälften vorgenommen. Vier Stunden später wurde das Euter ausgemolken und der Zellgehalt der Milch gemessen, wobei signifikant weniger Neutrophile in wiederholt stimulierten Vierteln festgestellt wurden. Bei der Gruppe der laktierenden Schafe wurde eine Euterhälfte mit 1µg LPS in 1ml 0,9%iger NaCl-Lösung jeden Morgen an 4 aufeinander folgenden Tagen nach dem Melken exponiert. In der Milch wurde jeweils 6h später der Zellgehalt bestimmt. Der Gehalt an Neutrophilen nahm von Infusion zu Infusion bis auf 16% des Wertes nach der ersten Infusion ab. Am 5. Tag wurden jeweils die nicht stimulierte Euterhälfte und die stimulierte Hälfte infundiert. Das Ergebnis war ein signifikant geringerer Gehalt an Neutrophilen in der stimulierten Hälfte. Die Reaktion in der nicht stimulierten Hälfte unterschied sich nicht von der nach der 1. Infusion in der stimulierten Hälfte. Man schloss hiermit auf einen rein lokal-protektiven Effekt, dem kein immunologischer „Crosstalk“ zwischen den einzelnen Euterhälften zugrunde lag.

Im selben Projekt wurden auch Versuche zur Resensibilisierung gemacht: Am ersten Tag erfolgte eine Infusion mit 50µg LPS in jede Euterhälfte, nach 2, 4, 6, 8 oder 10 Tagen wurde 1µg LPS in eine Euterhälfte jeweils eines Schafes von insgesamt 4 Versuchstieren infundiert. Sechs Stunden nach Infusion wurde der Gehalt an Neutrophilen in der Milch gemessen. Die

Antwort auf die Infusion fiel von Tag zu Tag stärker aus. Nach 9 Tagen war der auf die Infusion folgende Neutrophileneinstrom wieder wie nach der ersten Infusion<sup>284</sup>.

Kauf et al. (2007)<sup>285</sup> infundierten LPS in experimentell mit *Staphylococcus aureus* infizierte Euterviertel. Die Autoren beobachteten dabei eine gesteigerte entzündliche Immunantwort über die Induktion von TNF- $\alpha$ , einen erhöhten SCC und erhöhte Albumin-Werte. Einen Trend zu niedrigeren Bakterienzahlen während der Frühphase der durch die LPS-Infusion ausgelösten Entzündung glaubten die Autoren zu erkennen<sup>285</sup>.

Shuster und Harmon (1991) inokulierten Kühen mehrmals nacheinander LPS in einzelne Euterviertel<sup>286</sup>. In Gruppe 1 wurden den Tieren in 2 homolaterale Euterviertel nach dem Melken jeweils 10 $\mu$ g LPS an 4 aufeinander folgenden Melkzeiten appliziert. Die Autoren beobachteten einen Abfall der Milchleistung nach der ersten Inokulation. Nach der 4. Inokulation hatte sich die Milchleistung in den Kontrollvierteln fast wieder auf das Ausgangsniveau eingependelt, und auch die behandelten Viertel stiegen in der Milchleistung wieder an. Zum Ende des Beobachtungszeitraums (7. Melkzeit nach der letzten Infusion) hatte sich die Milchleistung wieder vollständig normalisiert. Der SCC stieg in den behandelten Vierteln auf  $\bar{x}$  5,5  $\pm$  0,9\*10<sup>6</sup> Zellen pro ml Milch an und blieb bis zur letzten Infusion auf diesem Niveau.

In einem zweiten Experiment wurde über 10 Melkzeiten jeweils 10 $\mu$ g LPS in 2 Euterviertel appliziert. Die Milchleistung in den nicht inokulierten Vierteln erreichte das Ausgangsniveau schon nach der 4. Infusion. In den inokulierten Vierteln blieb sie erniedrigt und erreichte die ursprüngliche Milchleistung erst wieder, nachdem die Viertel nicht mehr infundiert wurden. Die rektal gemessene Temperatur war 4,5h nach der ersten Infusion auf  $\bar{x}$  40,3 °C  $\pm$  0,7 °C angestiegen, sank danach aber wieder auf den Ausgangswert zurück und war bei den folgenden Infusionen nicht mehr erhöht<sup>286</sup>.

Suojala et al. (2008)<sup>287</sup> induzierten 2mal im Abstand von 14 Tagen durch Inokulation von 1500CFU *E. coli* in je ein unterschiedliches Viertel von Milchkühen eine Mastitis. Die klinischen Symptome der 2. Mastitis fielen generell milder aus als die der 1. Mastitis<sup>287</sup>.

Neben LPS wurden auch mit anderen TLR Liganden *in vivo*-Untersuchungen zur Modulation der initialen Immunantwort im Euter durchgeführt: Yu-Min Zhu et al. (2007)<sup>288</sup> infundierten zweimal im Abstand von 8 Tagen ein CpG-Oligonukleotid (TLR-9 Ligand) in jeweils eine Euterhälfte frischlaktierender Ziegen. Die zweite Euterhälfte wurde als Kontrollhälfte genutzt und analog mit PBS infundiert. Am Tag 9 nach der ersten Inokulation wurden beide Euterhälften mit jeweils 6\*10<sup>6</sup>CFU *E. coli* infiziert. Anschließend wurden Milch- und Blutproben gewonnen und die Tiere nach weiteren 72h euthanasiert. Es konnte gezeigt werden, dass TLR-9 auf mRNA-Ebene im Eutergewebe heraufreguliert, die IL-6-Produktion stimuliert und die Anzahl an Bakterien im Euter im Gegensatz zu den Kontrollvierteln reduziert wurde. Das Auftreten von Entzündungsmediatoren und die Entzündungsdauer waren verkürzt<sup>288</sup>.

Lohuis et al. (1990) inokulierten 100 $\mu$ g LPS von *E. coli* O:111 B:4 in beide hintere Viertel von gesunden laktierenden Milchkühen. 19h später infizierten sie diese Viertel mit 10<sup>4</sup>CFU *E. coli* O:157. Keines der infizierten Euterviertel entwickelte Anzeichen einer klinischen Mastitis und die Sekrete der infizierten Viertel waren 48h nach der Inokulation bakteriologisch negativ.<sup>32</sup>

Nach übereinstimmenden Ergebnissen funktioniert der Mechanismus der Endotoxintoleranz auch im Euter von Wiederkäuern und ein Einsatz in der Mastitisprophylaxe ist an dieser Stelle

denkbar. Um eine erwünschte Wirkung zu erzielen, müssen nach bisherigen Erkenntnissen die PAMPs direkt lokal appliziert werden, was im Euter zu einer Beeinträchtigung der Milchqualität führen kann. Einen Tag nach der Inokulation von einer verhältnismäßig großen Menge LPS ist der Zellgehalt in der Milch sehr hoch und damit ebenfalls die Präsenz von Abwehrzellen. Es ist also herauszufinden, ob die Verhinderung der Etablierung einer Mastitis durch *E. coli* rein auf dem hohen Zellgehalt in der Milch basiert, oder ob es zusätzliche Mechanismen der Endotoxintoleranz im Euter gibt, die die Etablierung einer Entzündung verhindern oder die entzündliche Reaktion abmildern können. Desweiteren bleibt bisher die Frage offen, wie lange der Schutz vor einer Infektion mit *E. coli* nach der Inokulation von LPS anhält. Hinweise aus der Literatur von aufeinanderfolgenden *E. coli*-Mastitiden legen nahe, dass ein schützender Effekt bereits nach 2 Wochen wieder aufgehoben ist<sup>287</sup>.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Geräte

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| Autoklav „D65“  | (Systec, Wetttemberg)                |
| Brutschrank „Incucell“  | (MMM Medcenter, Planegg)             |
| Bunsenbrenner mit automatischer Zündung   | (Wartewig, Göttingen)                |
| DeLaval cell counter DCC  | (DeLaval, Tumba, Schweden)           |
| Eismaschine „ZBE 70-35“   | (Ziegra, Isernhagen)                 |
| Thermometer   | (Microlife, Widnau, Schweiz)         |
| Fluoreszenz-Durchflusszytometer, Modell FACScan <sup>®</sup> ,<br>mit angeschlossener Computereinheit | (Becton Dickinson, Heidelberg)       |
| Heißluftsterilisator „Typ ST5050“   | (Heraeus, Hanau)                     |
| Mikroskop   | (Zeiss, Oberkochen)                  |
| Kühlschrank mit Gefrierfach (-20°C)   | (Einzelhandel)                       |
| Kühlzentrifuge „Rotina 420 R“   | (Hettich, Tuttlingen)                |
| Laborwaage „SBC22“  | (Scaltec Instruments, Heiligenstadt) |
| Melkanlage „RPA 40“   | (Westfalia, Oelde)                   |
| Multipette  | (Eppendorf, Hamburg)                 |
| Photometer “Spectra Classic”  | (Tecan, Crailsheim)                  |
| Pinzette, gebogen, anatomisch   | (Eickemeyer, Tuttlingen)             |
| Pipette, einstellbar „Transferpette <sup>®</sup> “ (2-20µl)   | (Brand, Wertheim)                    |
| Pipetten, einstellbar (1-10µl, 10-100µl, 20-200µl,<br>100-1000µl, 1-5ml )                             | (Biohit, Köln )                      |
| Pipettierhilfe „accu-jet <sup>®</sup> “   | (Brand, Wertheim)                    |
| Reinstwassersystem „GenPure“  | (TKA, Niederelbert)                  |
| Rüttler für Mikrotiterplatten „MTS 4“   | (IKA, Staufen)                       |
| Schlauchpumpe zum Absaugen von Flüssigkeiten<br>„Rumo100“   | (Heidolph, Schwabach)                |
| Schüttler „Vortex Genius 3“   | (IKA, Staufen)                       |
| Sicherheitswerkbank „Biowizard 130 GL“  | (Kojar, Vilppula, Finnland)          |
| Tiefkühltruhe (-80°C) „Forma ULT Freezer“   | (Thermo Electron, Dreieich)          |
| Tischzentrifuge „Universal 32 R“  | (Hettich, Tuttlingen)                |

|                            |                            |
|----------------------------|----------------------------|
| Viertelmelkmaschine        | (DeLaval, Tumba, Schweden) |
| Zählkammer nach Bürker     | (Brand, Wertheim)          |
| Zentrifuge „Universal 32R“ | (Roth, Karlsruhe)          |

## 3.2 Materialien

### 3.2.1 Klinikbedarf

|   |                                  |
|---|----------------------------------|
| Applikatoren, steril  | (Böttger, Bodenmais)             |
| Dalmarelin <sup>®</sup> , Lecirelin                                 | (Selectavet, Weyarn)             |
| Dalmazin <sup>®</sup> , Cloprostenol-Natriumsalz                    | (Selectavet, Weyarn)             |
| EDTA-Röhrchen „BD-Vacutainer <sup>®</sup> “                         | (Becton Dickinson, Plymouth, UK) |
| Einmalspritzen 5ml „Luer steril“                                    | (Terumo, Leuven, Belgien)        |
| Einmalspritzen 2ml „Luer steril“                                    | (Terumo, Leuven, Belgien)        |
| Einmal-Untersuchungshandschuhe “Gentle skin <sup>®</sup> sensitive“ | (Meditrade, Kiefersfelden)       |
| CIDR <sup>®</sup> -Insert   | (Pfizer, Aukland, New Zealand)   |
| CMT-Test  | (WDT, Garbsen)                   |
| Kanülen 1,80 x 40mm, steril „TSK STERIJECT“                         | (TSK-Supra, Tochigi/Japan)       |
| Oxytocin ad us. vet.  | (aniMedica, Senden-Bösensell)    |
| Polystyrol-Röhrchen steril  | (Sarstedt, Nümbrecht)            |
| Serum-Röhrchen 10ml   | (Sarstedt, Nümbrecht)            |
| Vacutainer Brand Luer Adapters                                      | (Becton Dickinson, Heidelberg)   |
| Vacutainerröhrchen, 10ml, EDTA-K2 (18mg)                            | (Becton Dickinson, Heidelberg)   |
| Vacutainerröhrchen, 10ml, Heparin (170IU)                           | (Becton Dickinson, Heidelberg)   |
| Vacutainerröhrchen, 10ml, ohne Zusatz                               | (Becton Dickinson, Heidelberg)   |

### 3.2.2 Laborbedarf

|                                  |                                 |
|----------------------------------|---------------------------------|
| Combitips, 1,25ml                | (Eppendorf, Hamburg)            |
| Combitips, 2,5ml                 | (Eppendorf, Hamburg)            |
| Cryo-Freezing-Container          | (Nalgen Co., Rochester, U.S.A.) |
| Einmal-Küvetten 2,5ml makro PMMA | (Brand, Wertheim)               |



|   |  |
|---|--|
| Einmal-Pasteurpipetten aus Pe-Ld.                                     | (Merck, Darmstadt)                                     |
| Eppendorf-Reaktionsgefäß, 0,5ml                                       | (Sarstedt, Nümbrecht)                                  |
| Eppendorf-Reaktionsgefäß, 1,5ml                                       | (Greiner, Frickenhausen)                               |
| Drigalski-Glasspatel  | (Roth, Karlsruhe)                                      |
| Cryotubes 3,5ml   | (Roth, Karlsruhe)                                      |
| Cryotubes 5ml   | (Roth, Karlsruhe)                                      |
| Laborflaschen mit Gewinde, 500ml                                      | (VWR international, Hannover)                          |
| Mikrobank-System Cryobank™  | (Mast Diagnostika, Reinfeld)                           |
| Multipetteneinsatz  | (Eppendorf, Hamburg)                                   |
| Pasteurpipetten, 22,5mm aus Glas                                      | (Brand, Wertheim)                                      |
| Pipettenspitzen, weiß, gelb und blau                                  | (Sarstedt, Nümbrecht)                                  |
| Pipettenspitzen 200µl   | (Brand, Wertheim)                                      |
| Polystyrolröhrchen  | (Nerbe Plus, Winsen/Luhe)                              |
| Röhrchen für die Durchflusszytometrie, 5ml                            | (Becton Dickinson, Heidelberg)                         |
| Rundboden-Mikrotiterplatten mit Abdeckung; steril,<br>96 Vertiefungen | (Gechno Plastic Products TPP®,<br>Trasadingen/Schweiz) |
| Saugpipetten, 10ml  | (Sarstedt, Nümbrecht)                                  |
| Schraubdeckeldosen „Rotilabo®“  | (Roth, Karlsruhe)                                      |
| Spatel  | (Roth, Karlsruhe)                                      |
| Zentrifugenröhrchen, 50ml aus Polypropylen<br>(Falcons, steril)       | (Corning, Wiesbaden)                                   |
| Zentrifugenröhrchen, 15ml aus Polypropylen (steril)                   | (Sarstedt, Nümbrecht)                                  |

### 3.2.3 Reagenzien, Medikamente und andere Verbrauchsmaterialien

|   |                                |
|---|--------------------------------|
| Acridin-Orange  | (Sigma-Aldrich, Steinheim)     |
| Columbia Schafblut-Agar   | (Oxoid, Wesel)                 |
| Edwards-Nährboden mit Schafblut (mod.)  | (Oxoid, Wesel)                 |
| Ethanol 70%   | (Roth, Karlsruhe)              |
| FACS Clean  | (Becton Dickinson, Heidelberg) |
| FACS Rinse  | (Becton Dickinson, Heidelberg) |
| Gassner-Agar  | (Oxoid, Wesel)                 |
| Hirn-Herz-Boillon, brain-heart-infusion-broth (BHI)                                       | (Oxoid, Wesel)                 |
| Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar (VRB-Agar)   | (Oxoid, Wesel)                 |
| Natriumchlorid (NaCl)   | (Sigma, Steinheim)             |
| Propidiumiodid (PI)   | (Calbiochem, Bad Soden)        |
| Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) Dulbecco, ohne Ca <sup>++</sup> /Mg <sup>++</sup> | (Biochrom, Berlin)             |
| RNAlater®   | (Sigma, Steinheim)             |
| Sheath-fluid für Durchflusszytometrie   | (Becton Dickinson, Heidelberg) |
| Trypton-Soja-Bouillon, trypticase-soy-broth (TSB)   | (Sigma, Steinheim)             |

### 3.2.4 Puffer und Lösungen

#### 3.2.4.1 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ohne EDTA

Die PBS-Trockensubstanz (siehe 3.2.3) wurde mit *Aqua tridest.* gelöst. Die Bestandteile lagen in den folgenden Konzentrationen vor:

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| NaCl                             | 8,0g   |
| KCl                              | 1,24g  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0,2g   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0,2g   |
| <i>Aqua tridest.</i> ad          | 1000ml |

Der Puffer hatte einen pH-Wert von 7,4. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

#### 3.2.4.2 Wasch- und Verdünnungspuffer für die Membranimmunfluoreszenz

|                      |        |
|----------------------|--------|
| bovines Serumalbumin | 5,0g   |
| Natriumazid          | 0,1g   |
| PBS ad               | 1000ml |

Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

### 3.2.4.3 Lösungen für die Durchflusszytometrie

Zur Reinigung des Gerätes wurde das Messkanalsystem nach den Messungen mit sterilfiltriertem *Aqua tridest.* (0,2µl), FACS Clean und FACS Rinse gespült.

#### *Trägerflüssigkeit (Sheath fluid)*

Als Trägerflüssigkeit für die durchflusszytometrische Messung wurde sterilfiltriertes PBS (0,2µm) mit 0,1mg/ml NaN<sub>3</sub> (Natriumazid) verwendet.

#### *Propidiumjodid-Stammlösung*

Die Stammlösung von 100µg/ml Propidiumjodid gelöst in Trägerflüssigkeit wurde in aliquoten Teilen bei -20°C gelagert. Zum Anfärben toter Zellen wurden der Trägerflüssigkeit entsprechende Teile der Stammlösung zugesetzt, um eine Endkonzentration von 2µg/ml zu erreichen.

#### *Acridin-Orange-Stammlösung*

Eine Stammlösung von 0,5µg/ml Acridin-Orange, gelöst in Trägerflüssigkeit (siehe oben), wurde in aliquoten Teilen bei 4°C gelagert. Vor jedem Einsatz wurde sie auf das Vorhandensein von ausgefällten Anteilen überprüft und nötigenfalls verworfen. Entsprechende Teile der Stammlösung wurden den Milchzellsuspensionen zugesetzt, um eine Endkonzentration von 2,5pg/ml zu erreichen.

### 3.2.5 Versuchstiere

Die im Rahmen des Projekts verwendeten Tiere wurden nach den Kriterien des standardisierten Tiermodells ausgewählt (siehe 3.3.2). Verwendet wurden nur Tiere der Rasse Holstein-Friesian, die sich in der ersten Laktation, 2-6 Monate in Milch befanden, klinisch gesund und nach Vorbericht noch nie an einer Mastitis erkrankt waren. Die Milch aller 4 Euterviertel musste frei von Bakterien sein und einen Zellgehalt von unter  $5 \cdot 10^4$ /ml Milch aufweisen. Auf diese Kriterien wurden die Tiere im Herkunftsbetrieb zweimal im Abstand von mindestens 7 Tagen untersucht.

Alle 21 im Rahmen des Versuchs verwendeten Tiere erfüllten diese Voraussetzungen. Die Tiere waren 27 bis 36 Monate alt, befanden sich in der ersten Laktation und waren 63 bis 146 Tage in Milch. Alle Tiere stammten aus bayerischen und baden-württembergischen Zuchtbetrieben. Die steril gewonnenen Viertelgemelksproben wurden auf Columbia-Schafblutagar, Edwardsagar und VRB-Agar (siehe 3.2.3) ausgestrichen und anschließend über 48h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Mindestens 2 Wochen vor Versuchsbeginn wurden die Tiere in der Klinik für Wiederkäuer der Ludwig-Maximilians-Universität München in Oberschleißheim in einem abgeschlossenen, 4 Kuhplätze umfassenden Stallabteil aufgestellt. Die Tiere standen auf Gummimatten mit Stroheinstreu und wurden mit TMR und Heu *ad libitum* und leistungsabhängigen Mengen an Kraftfutter und Getreideschrot gefüttert. Ab dem Tag der Einstellung an der Klinik für Wiederkäuer in Oberschleißheim wurde täglich zweimal die Milchleistung, die rektal gemessene Temperatur und die Futterraufnahme dokumentiert.

### 3.2.6 Modellbakterien

Der verwendete Bakterienstamm *E. coli* 1303 wurde aus dem Milchsekret einer an klinischer Mastitis erkrankten Kuh in der Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover isoliert. Die Stammhaltung der Bakterien in Glycerinstocks und die biochemische Charakterisierung erfolgte freundlicherweise im Institut für Mikrobiologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. Valentin-Weigand. Der Stamm wurde nach der für *Enterobacteriaceae* zusammengestellten „Bunten Reihe“ charakterisiert (siehe Tabelle 5)<sup>289</sup>. Die benötigten Testmedien wurden im Institut für Mikrobiologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover hergestellt.

**Tabelle 5: Biochemisches Reaktionsspektrum des verwendeten *E. coli*-Stamms 1303**

|   |                                     |   |                            |
|---|-------------------------------------|---|----------------------------|
| - | Kligler (H <sub>2</sub> S-Nachweis) | + | Methylrot                  |
| + | Indolbildung                        | - | Voges-Proskauer-Reaktion   |
| - | Zitrat                              | + | Glukose                    |
| - | Urease                              | + | Gasbildung                 |
| - | Malonat                             | + | Laktose                    |
| - | Phenylalanindecaboxylase            | - | Saccharose                 |
| + | Lysindecaboxylase                   | + | Adonit                     |
| - | Ornithindecaboxylase                | + | Rhamnose                   |
| - | Gelatinase                          | + | Oxidativer Glukoseabbau    |
| - | Motilität                           | + | Fermentativer Glukoseabbau |

+ = positiver Nachweis; - = kein Nachweis

Das Isolat *E. coli* 1303 aus einer Kuh mit klinischer Mastitis gehört zur phylogenetischen Hauptgruppe A von *E. coli* (*E. coli*-Sammlung von Referenzstämmen, ECOR-A). Einem multiplex PCR-basierten Screening von Virulenz-assoziierten Genen von pathogenen *E. coli* zufolge<sup>290,291</sup>, repräsentiert dieser Stamm kein extraintestinales oder intestinales pathogenes *E. coli*-Isolat. Es konnten nur die Gene identifiziert werden, die Typ 1 Fimbrien, F17 Fimbrien, Antigen 43, das Eisenzitratsiderophorensystem and das EAST1-Toxin kodieren (Dobrindt, persönliche Mitteilung).

Neben den oben beschriebenen Eigenschaften wurde ein Antibiogramm von *E. coli* 1303 mittels Agargel-Diffusion in der Zentrumsabteilung Hygiene und Technologie der Milch des Zentrums für Lebensmittelwissenschaften der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover unter der fachlichen Anleitung von Frau Dr. Schröder durchgeführt (siehe Tabelle 6).

Die Lagerung der Bakterienstämme erfolgte in Einheiten von 20 Cryoballs pro 1ml Cryotube mittels „Cryobank™“-System (siehe 3.2.2) bei -80°C in der Tiefkühltruhe. Pro Experiment wurde somit immer auf ein neues tiefgefrorenes Aliquot zurückgegriffen. Der Erreger musste deshalb nicht subkultiviert werden.

**Tabelle 6: Antibiotika-Resistenzprofil des verwendeten Stammes *E. coli* 1303**

| <b>Antibiotika</b>            | <b><i>E. coli</i></b> |
|-------------------------------|-----------------------|
| Amoxicillin/Clavulansäure     | S                     |
| Ampicillin                    | S                     |
| Apramycin                     | S                     |
| Cefquinom                     | S                     |
| Cephalothin                   | R                     |
| Colistin                      | S                     |
| Enrofloxazin                  | S                     |
| Erythromycin                  | R                     |
| Gentamicin                    | S                     |
| Neomycin                      | S                     |
| Tetracyclin/Oxytetracyclin    | R                     |
| Trimethoprim/Sulphamethoxazol | S                     |

S= sensibel; R= resistent;

### 3.2.7 Antikörper

Für die Zelldifferenzierung mittels Membranimmunfluoreszenz kamen die in Tabelle 7 genannten Antikörper zum Einsatz:

**Tabelle 7: Monokonale Antikörper zur Charakterisierung zellulärer Oberflächenstrukturen**

| <b>Name</b>                                   | <b>Spezifität</b>                                     |
|---|---|
| MouseAntiBovineCD4:Fitc*                      | bovines CD4   |
| MouseAntiBovineCD8BETA:RPE*                   | bovines CD8   |
| MouseAntiHumanCD14:RPE-AlexaFluor®647*        | humanes CD14 (Kreuzreaktion mit bovinem CD14)         |
| MouseAntiSheepMHCclassIIDQDRPolymorphic:Fitc* | ovines MHC Klasse II (Kreuzreaktion mit bovinem CD14) |

\*AbD Serotec, Morphosys UK, Kidlington, Oxford, UK

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Tierschutzantrag

Bei den Tierversuchen handelte es sich um ein durch die Regierung von Oberbayern genehmigtes Versuchsvorhaben mit dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-108-05.

#### 3.3.2 Modellbedingungen und Voruntersuchungen der Probanden

Für die Tierversuche wurden nur Tiere der Rasse Holstein-Friesian verwendet, die sich in der ersten Laktation, 2-6 Monate in Milch befanden, klinisch gesund und nach Vorbericht noch nie an einer Mastitis erkrankt waren. Die Milch aller vier Euterviertel musste frei von Bakterien sein und einen Zellgehalt von unter  $5 \cdot 10^4$ /ml Milch aufweisen. Die steril gewonnene Milch wurde auf Columbia Schafblut-Agar, Edwards-Agar und VRB-Agar ausgestrichen und anschließend über 36h bei 37°C im Brutschrank bebrütet. Diese Untersuchung wurde im Herkunftsbetrieb 2mal im Abstand von einer Woche durchgeführt. Es wurden dabei nur Tiere ausgewählt, deren bakteriologische Milchuntersuchung 2mal negativ ausfiel.

Im Herkunftsbetrieb wurde eine klinische Allgemeinuntersuchung durchgeführt und dabei das Haarkleid, Verhalten, Ernährungszustand, Hautturgor, Bulbi, Schleimhäute, Lymphknoten, Atemfrequenz, Skleralgefäße, Venen, Harn, Euter, Abdomenform, Bauchdeckenspannung, Darmmotorik und der Kot beurteilt. Ferner wurde die Auskultation der Atmung und des Herzens, die Lungenperkussion, die Pansenauskultation, die Schwing- und Perkussionsauskultation des Pansens, Fremdkörperproben, Leberperkussion und die rektale Untersuchung mit Beurteilung des Geschlechtsapparates, der Darmbeinlymphknoten, des Unterdrucks, des Bauchfells, des Pansens sowie der linken Niere durchgeführt. Nur wenn alle Parameter physiologische Werte zeigten und das Tier als klinisch gesund einzustufen war, wurde es angekauft.

#### 3.3.3 Herstellung von LPS

Das verwendete LPS aus dem *E. coli*-Stamm 1303 wurde am Lehrstuhl für Biochemische Pharmakologie im Fachbereich Biologie der Universität Konstanz unter Leitung von Frau Dr. Sonja von Aulock hergestellt. Dazu wurde zuerst aus einer Bakterienreinkultur von *E. coli* 1303 eine Suspension mit einer definierten Anzahl an CFU hergestellt. Die mit PBS verdünnte Suspension wurde anschließend durch Bestrahlung mit UV-Licht inaktiviert. Der Aufschluss der Bakterienzellwand mit anschließender LPS-Präparation erfolgte nach einer von Herrn Dr. S. Morath entwickelten Methode<sup>292</sup>. Dabei wurden nach Suspendierung der Bakterien in Natriumzitratlösung die Zellwände durch Ultraschall mit Hilfe eines Sonifiers aufgeschlossen. Die Suspension wurde anschließend mit n-Butanol versetzt und die Phasen durch Zentrifugieren der Suspension getrennt. Die dadurch gewonnene wässrige Phase mit dem LPS wurde dann durch eine hydrophobe Interaktionschromatographie auf einer Octyl-Sepharose-Säule in einer Fast Protein Liquid Chromatography-Anlage weiter aufgereinigt. Die LPS-haltigen Fraktionen wurden durch Inkubation mit Vollblut identifiziert, indem mittels ELISA die Cytokinfreisetzung von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  bestimmt wurde. Mit der Methode von M. Hirschfeld (2000)<sup>293</sup> wurde das extrahierte LPS mit Triethylamin-Lösung und Deoxycholat nachgereinigt. Durch Inkubation bei -20°C wurde das LPS ausgefällt, mit Ethanol nochmals gereinigt und anschließend für den Versand luftgetrocknet.

### 3.3.4 Herstellung der Inokulationsdosis von LPS

Das LPS wurde in 5ml steriler 0,9%iger NaCl-Lösung zu einer Konzentration von 0,2µg/ml verdünnt. Die Gebrauchsverdünnung wurde dann in Portionen zu 5ml bei -20°C im Gefrierschrank in sterilen 10ml PP-Test Tubes bis zum Beginn des Experiments konserviert. Am Tag der Inokulation wurde pro Viertel eine Portion im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

### 3.3.5 Intramammäre Applikation von LPS

Nach dem normalen Melkakt wurde den Kühen 2ml Oxytocin i.v. injiziert und anschließend mit einer speziellen 4/4-Melkmaschine (siehe 3.1), zur Aufnahme getrennter Viertelgemelke, nochmals ausgemolken. Die gewonnene Milchmenge pro Viertel wurde dokumentiert. Die Zitzen der einzelnen Euterviertel wurden mit 70%igem Ethanol getränktem Haushaltspapier gründlich gereinigt und pro Viertel 5ml der körperwarmen LPS-Lösung (0,2µg/ml) mittels einer Einwegspritze über eine Zitzenkanüle injiziert. Während die Zitzenkanüle aus dem Zitzenkanal nach der Injektion entfernt wurde, wurde die Zitzenkuppe mit Daumen und Zeigefinger zusammengedrückt, um ein Zurücklaufen der Flüssigkeit zu verhindern. Bei verschlossenem Zitzenkanal wurde dann mit der anderen Hand der Inhalt in der Zitzenzisterne 5mal Richtung Drüsenzisterne ausgestrichen und anschließend das Drüsengewebe 30 Sekunden lang durchmassiert, um eine gleichmäßige Verteilung des LPS zu erreichen.

### 3.3.6 Präparation der Infektionsdosis

Der in den Versuchen eingesetzte *E. coli*-Stamm 1303 wurde aus dem Milchsekret einer klinisch an Mastitis erkrankten Kuh (Patient der Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) isoliert (siehe 3.2.6). Die Bakterien lagen kryokonserviert auf Cryoballs vor (Mikrobanksystem „Cryobank™“). Nach dem Ausplattieren auf einem Columbia Schafblut-Agar folgte eine Inkubation bei 37°C. Nach 24h wurden mehrere Kolonien mittels einer Öse in 10ml Hirn-Herz-Bouillon (brain-heart-infusion-broth, BHI) überführt, auf dem Vortexer gut durchmischt und 6h bei 37°C inkubiert. Nach erneutem intensivem Durchmischen wurden 100µl dieser Suspension in 9,99ml Trypton-Soja-Bouillon überführt, gut durchmischt und über 18h bei 37°C inkubiert. Um eine definierte Anzahl Kolonie-bildender Einheiten (engl: Colony forming units, CFU) zu erlangen, wurde die photometrisch bestimmte optische Dichte einer Bouillon mit der Keimzahlbestimmung durch das Spatelverfahren verknüpft. Dazu wurde zunächst eine Verdünnungsreihe in Zehnerschritten mit 0,9%iger NaCl-Lösung bis zu einer Stufe von  $10^{-8}$  hergestellt. 100µl der Verdünnungsstufen  $10^{-4}$  bis  $10^{-8}$  wurden daraufhin als Triplikate auf Columbia Schafblut-Agar Platten mit einem Drigalski-Glasspatel ausgestrichen. Die Platten wurden daraufhin bei 37°C über 24h inkubiert. Platten, die zwischen 3 und 300 Kolonien aufwiesen, wurden ausgezählt. Diese Zahl wurde nun ins Verhältnis mit der photometrisch bestimmten optischen Dichte (OD) der ersten Verdünnungsstufe ( $10^{-1}$ ) gesetzt. Durch wiederholt reproduzierbare Werte nach Ausplattieren konnte eine Eichkurve erstellt werden, die es ermöglichte, durch Ermittlung der OD der ersten Verdünnungsstufe bei einer Wellenlänge von 623 nm auf die Zahl der CFU in der Bouillon zu schließen. Mit ihrer Hilfe wurde danach durch Bestimmung der OD in der Bouillon die entsprechende Bakterienkonzentration in CFU errechnet. Die angestrebte *E. coli*-Infektionsdosis von 250CFU/ml wurde mit entsprechenden Teilen steriler 0,9%iger NaCl-Lösung eingestellt und durch Ausplattieren sowie Inkubation bei 37°C über 24h kontrolliert.

### 3.3.7 Experimentelle Infektion einzelner Euterviertel

Nach dem Melken wurde den Kühen 2ml Oxytocin i.v. injiziert und anschließend mit der 4/4-Melkmaschine nochmals ausgemolken. Die gewonnene Milchmenge pro Viertel wurde dokumentiert. Die Viertel wurden mit 70%igem Ethanol getränktem Haushaltspapier gründlich gereinigt. Die Infektionsdosis wurde in einem Volumen von 2ml mittels einer Einwegspritze und einer Zitzenkanüle in die Zitzenzisterne instilliert. Die Zitzenkuppe wurde dabei mit Daumen und Zeigefinger zusammengehalten, während die Zitzenkanüle aus dem Zitzenkanal entfernt wurde, um ein Zurücklaufen der Infektionsdosis zu verhindern. Bei verschlossenem Zitzenkanal wurde dann mit der anderen Hand der Inhalt in der Zitzenzisterne 5mal Richtung Drüsenzisterne ausgestrichen und anschließend das Drüsengewebe 30 Sekunden lang durchmassiert, um eine gleichmäßige Verteilung der Infektionsdosis zu erreichen.

### 3.3.8 Gewinnung der Milchproben

Vor Beginn des Melkens wurden erst so viele Strahlen Milch in die Vertiefungen einer California Mastitis Test (CMT)-Schale gemolken, bis beim Ankippen der Schale bis zum Eichstrich Milch stand (ca. 1,8ml). Anschließend wurde die Milch grobsinnlich beurteilt und der CMT durchgeführt. Die Zitzen wurden dann naß von groben Verschmutzungen gereinigt und die Zitzenkuppen mit 70%igem Ethanol getränktem Haushaltspapier gründlich vorbereitet. Danach wurden aus jedem Viertel ca. 5ml Milch steril entnommen und zur bakteriologischen Untersuchung umgehend ins Labor gebracht. Nach kurzem manuellen Anrühren des Euters wurde die 4/4-Melkmaschine ans Euter angesetzt. Nach Beendigung des Melkakts wurde die Milchmenge pro Viertel gemessen und Milch zur Untersuchung auf Inhaltstoffe und Zellgehalt (siehe 3.3.12), zur Zellcharakterisierung und -quantifizierung (siehe 3.3.13) entnommen.

### 3.3.9 Erhebung und Beurteilung allgemeiner klinischer Parameter

Der klinische Status der Tiere wurde zu folgenden Zeitpunkten überprüft:

*Gruppe „no priming“ (Kontrollgruppe infiziert ohne Vorbehandlung; n=5):*

Zweimal im Abstand von einer Woche im Herkunftsbetrieb, bei Einstellung an der Klinik für Wiederkäuer der LMU München, daraufhin im wöchentlichen Rhythmus, unmittelbar vor der Infektion, zu den Zeitpunkten 3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h und 24h nach der Infektion.

*Gruppe „72h priming“ (72h nach LPS-Inokulation ins Euter infiziert; n=5):*

Zweimal im Abstand von einer Woche im Herkunftsbetrieb, bei Einstellung an der Klinik, daraufhin im wöchentlichen Rhythmus, unmittelbar vor LPS-Inokulation, zu den Zeitpunkten 3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 24h, 36h, 48h, 60h und 72h nach LPS-Inokulation, letzterer entspricht dem Zeitpunkt der Infektion, zu den Zeitpunkten 3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h und 24h nach Infektion.

*Gruppe „10d priming“ (10d nach LPS-Inokulation ins Euter infiziert; n=10):*

Zweimal im Abstand von einer Woche im Herkunftsbetrieb, bei Einstellung an der Klinik, daraufhin im wöchentlichen Rhythmus, unmittelbar vor LPS-Inokulation, zu den Zeitpunkten 3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, 120h, 168h und 240h nach LPS-Inokulation, letzterer entspricht dem Zeitpunkt der Infektion, zu den Zeitpunkten 3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h und 24h nach Infektion.



15 Tiere (je 5 der oben angegebenen 3 Gruppen) wurden zum Zeitpunkt 24h nach der Infektion geschlachtet. 5 Tiere der Gruppe „10d priming“ wurden weiter zu den Zeitpunkten 48h, 72h, 132h, 204h, 276h, 396h, 516h und 626h beurteilt.

Zu den Beobachtungszeitpunkten wurde die Körpertemperatur, die Herzfrequenz, die Schleimhautfarbe, die Pansenmotorik, die Futteraufnahme, die Körperhaltung und das Verhalten der Tiere festgestellt, dokumentiert und hinsichtlich des Grades einer Störung bewertet.

### 3.3.10 Erhebung und Beurteilung von Parametern am Euter

#### 3.3.10.1 Adspektion des Euters

Die Adspektion des Euters wurde zu jedem Beobachtungszeitpunkt nach der Infektion ausgeführt und dabei das infizierte Euterviertel vergleichend zu den nicht infizierten Eutervierteln beurteilt. Beschrieben wurden dabei die Farbe der Euterhaut und die Abweichung in der Größe in den Abstufungen geringgradig, mittelgradig und hochgradig vergrößert.

#### 3.3.10.2 Palpation des Euters

Die Palpation des Eutergewebes wurde ab Versuchsbeginn zu jeder Melkzeit (alle 12h) am ausgemolkenen Euter durchgeführt. Als Parameter wurden die drei Merkmale „Induration des Eutergewebes“, „Ausbildung eines subkutanen Ödems“ (Verschiebbarkeit der äußeren Haut) und „vermehrte Wärme“ gewählt. Jedes dieser Merkmale wurde zu jeder Melkzeit mit den 4 Abstufungen „ohne besonderen Befund“, „geringgradig“, „mittelgradig“ und „hochgradig“ beurteilt.

#### 3.3.10.3 Beurteilung des Eutersekrets

Zu jeder Melkzeit während der Beobachtungszeit wurde in einer schwarzen Viertelgemelksschale die Beschaffenheit des Eutersekrets beurteilt und dokumentiert. Tabelle 8 zeigt die Einteilung der Eutersekretbefundung.

**Tabelle 8: Einteilung des Eutersekretbefundes (nach Rosenberger et al. [1990]<sup>294</sup>)**

|     |  |
|-----|--|
| obB | normaler Milchcharakter ohne besonderen Befund         |
| A   | Milchcharakter erhalten, wässrig ohne Flocken          |
| B   | Milchcharakter erhalten, wässrig mit kleinen Flocken   |
| C   | Milchcharakter erhalten, einige grobe Flocken          |
| D   | Milchcharakter erhalten, viele grobe Flocken           |
| E   | Milchcharakter weitgehend verloren, vorwiegend Flocken |
| F   | Milchcharakter völlig aufgehoben                       |

#### 3.3.11 Bakteriologische Untersuchung des Eutersekrets

Die unter antiseptischen Bedingungen entnommene Milch wurde unmittelbar nach der

Entnahme auf Eis gelagert. Aus jeder Milchprobe wurde mittels einer sterilen Impföse (Durchmesser 5mm) durch einmaliges Eintauchen die nochmals resuspendierte Milch entnommen und jeweils auf Columbia Schafblut-Agar, Edwards-Nährboden mit Schafblut und Kristallviolett-Galle-Lactose-Agar (siehe 3.2.3) ausgestrichen. Vom Eutersekret aus den infizierten Vierteln wurden zusätzlich die Verdünnungsstufen 1:10 und 1:100 mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung hergestellt und jeweils 100µl auf den o.g. Nährböden ausgestrichen, um die bakterielle Kontamination (CFU/ml) des Eutersekrets quantifizieren zu können. Die Agarplatten wurden anschließend über 12-24h bei 37°C im Brutschrank bebrütet und die Kolonien ausgezählt. Anschliessend wurden die Platten über weitere 24-36h (insgesamt 48h) bebrütet und erneut ausgewertet.

### **3.3.12 Bestimmung von Inhaltsstoffen und des somatischen Zellgehalts (SCC) der Milch**

Die in spezielle Gefäße, in denen das Konservierungsmittel Acidiol vorgelegt war, überführten Milchproben wurden an das Zentrallabor des Milchprüfrings Bayern in Wolnzach gesandt. Die Bestimmung des SCC erfolgte durch fluoreszenzoptische Zählung somatischer Zellen (1000/ml) in Rohmilch mit dem Fossomatic<sup>®</sup>-5000. Die Untersuchung der Rohmilch auf Fett- und Eiweißgehalt (%) erfolgte mit einer Infrarot-spektroskopischen Methode mit dem MilcoScan-FT-6000. Die Untersuchung auf den Laktosegehalt (%) erfolgte ebenfalls mit dem MilcoScan-FT-6000 nach einer Hausmethode der Firma FOSS Deutschland, Hamburg.

Zusätzlich zur fluoreszenzoptischen Zählung beim Milchprüfring Bayern wurde der SCC stets parallel in der Klinik für Wiederkäuer in Oberschleißheim mit einem DeLaval cell counter DCC bestimmt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt dabei durch fluoreszenzoptische Messung in  $1 \cdot 10^3$ /ml.

### **3.3.13 Aufarbeitung der Milchproben für die durchflusszytometrische Zellcharakterisierung**

Um verfälschte Ergebnisse durch absterbende Zellen zu vermeiden, erfolgte die Aufarbeitung der Milchproben stets auf Eis und unmittelbar nach ihrer Gewinnung. Zur Analyse am Durchflußzytometer wurden 10ml Milch aus dem Hauptgemelk in ein steriles 50ml Zentrifugenröhrchen gegeben, in dem 40ml PBS vorgelegt war. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert (400 x g, 10Min., 4°C, ohne Bremse). Der Rahm, der sich am oberen Rand des Gefäßes abgesetzt hatte, wurde vorsichtig mit einem Spatel gelöst und mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt; danach wurde der flüssige Überstand ohne abzusetzen dekantiert. Das verbleibende Zellpellet wurde in 50ml PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert (400 x g, 10Min., 4°C, ohne Bremse). Der Überstand wurde erneut verworfen und das wieder in 50ml PBS resuspendierte Zellpellet noch mal abzentrifugiert (400 x g, 10 Min., 4°C, ohne Bremse). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 1ml PBS resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 100µl auf ca.  $2 \cdot 10^6$  Zellen eingestellt und in ein FCM-Röhrchen gegeben, in das 200µl Trägerflüssigkeit (4µg/ml PI) und 15µl Acridin-Orange-Lösung vorgelegt worden waren.

### **3.3.14 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung von Partikeln nach Größe und Oberflächenbeschaffenheit. In einem Probenführungssystem werden dazu Einzelzellen an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Dabei wurde gestreutes Licht einer speziellen Wellenlänge (hier 488 nm) in Richtung des Strahls als sogenanntes Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter,

FSC) oder im 90°-Winkel dazu als Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) erfasst. Die Vorwärtsstreuung charakterisiert dabei die Partikelgröße und dessen Refraktionsindex, die Seitwärtsstreuung die Komplexität (Oberflächenbeschaffenheit und Granularität) eines Partikels. Im Durchflusszytometer werden entsprechende Signale erfasst und an den angeschlossenen Computer weitergeleitet, mit dessen Hilfe auch die Geräteeinstellungen kontrolliert werden. Im Computer werden dann auch die Messereignisse erfasst und gespeichert<sup>295,296</sup>.

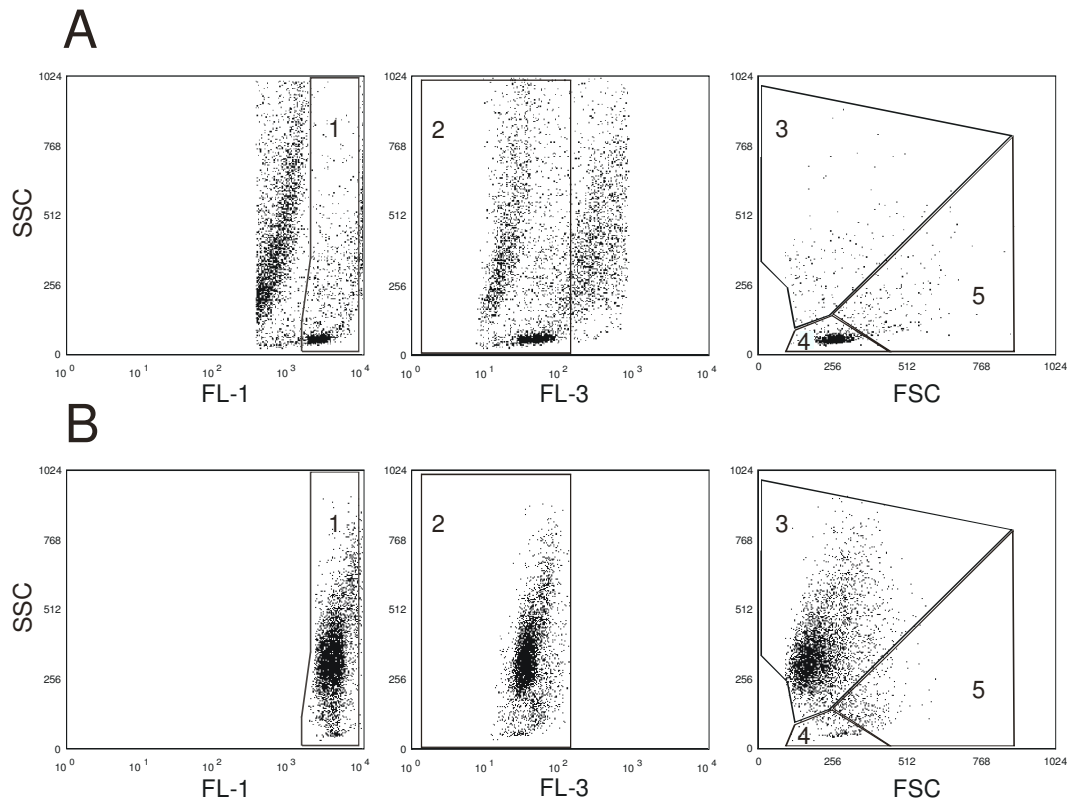
Bei diesen Versuchen kam ein FACScan<sup>®</sup>-Durchflusszytometer zum Einsatz (mit einem Argonlaser mit einer Lichtemission einer Wellenlänge 488nm). Mit entsprechenden Detektoren erfasst das Gerät Fluoreszenzlicht-Emissionen in drei verschiedenen Wellenlängenbereichen: FL-1 = Grünfluoreszenz der Wellenlänge 515-545nm; FL-2 = Orangefluoreszenz der Wellenlänge 564-606nm; FL-3 = Rotfluoreszenz der Wellenlänge >650nm. Durch fünf verschiedene Parameter (FSC, SSC, FL-1, FL-2, FL-3) wird damit jedes Messereignis charakterisiert.

Die computergestützte Auswertung der Daten erfolgte mit der Software FCS Express V3. Ergebnisse wurden mehrparametrisch als korrelierte Punkte- oder Dichtediagramme dargestellt. Die Werte der einzelnen Parameter hängen stark von den Einstellungen für FSC, SSC und die Fluoreszenzdetektoren ab. Um die Messungen vergleichbar zu machen, wurden sie deshalb stets mit identischen Geräteeinstellungen erfasst.

### **3.3.15 Vitalitätsbeurteilung und Quantifizierung der Milchzellen nach Acridin-Orange/Propidiumjodid-Färbung**

Um die Vitalität von Zellen zu beurteilen, kann man Zellsuspensionen mit einer Acridin-Orange-Lösung versetzen. Acridin-Orange dringt in die Zelle ein und interkaliert mit der doppelsträngigen DNA. Der Kern erscheint unter UV-Anregung dann grün-fluoreszierend. Weist die Zellmembran Schädigungen auf, so kann das Fluorochrom Propidiumjodid (PJ) in die Zelle eindringen und mit der DNA interkalieren. Tote Zellen sind nach durchflusszytometrischer Analyse im FL-3-Kanal (Rotfluoreszenz) erfassbar und können dadurch von ungeschädigten Zellen unterschieden werden.

Nach der Messung wurden softwaregestützt elektronische „Fenster“ (sog. „Gates“) gesetzt, um einzelne Untergruppen der Messereignisse („Events“) zu definieren und zum Teil mehrere Fenster logisch miteinander zu verknüpfen. Dazu wurden die Proben zunächst im Seitwärtsstreulicht (SSC) gegen Grünfluoreszenz (FL-1) erfasst, um nicht kernhaltige Ereignisse von der Erfassung auszuschließen und ein Fenster („live-gate“) auf die grün-fluoreszierenden, Acridin-Orange-positiven Ereignisse gesetzt. Nachdem diese Ereignisse erfasst waren, wurde im FL3/SSC-Punktendiagramm ein Fenster auf Propidiumjodid-negative Ereignisse gesetzt und davon die morphologisch als Zellen erkennbaren Ereignisse in einem weiteren Fenster identifiziert. Wie bei Petzl (2005)<sup>297</sup> beschrieben, können im Punktendiagramm FSC/SSC einzelne Zellsubpopulationen wie PMN, lymphoide Zellen und Makrophagen oder Epithelzellen anhand ihrer morphologischen Charakteristika identifiziert werden und durch die Zählung der Ereignisse auch quantitativ erfasst werden. Da ja auch die Zahl der somatischen Zellen (SCC) in jeder Milchprobe erfasst wurde (siehe 3.3.12), konnten so die absoluten Zahlen der einzelnen Zellsubpopulationen pro ml Milch errechnet werden.



**Abbildung 2: Durchflusszytometrische Analyse einzelner vitaler Milchezellpopulationen anhand ihrer Anfärbbarkeit und Morphologie in niedrig- und hochzelliger Milch**

Dargestellt sind Punktediagramme nach Erfassung von 20.000 Ereignissen niedrig- (A) wie hochzelliger (B) Milch im Durchflusszytometer. FL-1: (Grünfluoreszenz gegen Komplexität) Identifizierung Fluoreszenz-positiver, kernhaltiger Ereignisse (Region 1). FL-3: (Rotfluoreszenz gegen Komplexität) Identifizierung der PI-negativen Ereignisse (Region 2 = vitale Zellen) FSC: Darstellung der Morphologie (Größe gegen Komplexität). PMN (Region 3), Lymphozyten (Region 4), Makrophagen und Epithelzellen (Region 5).

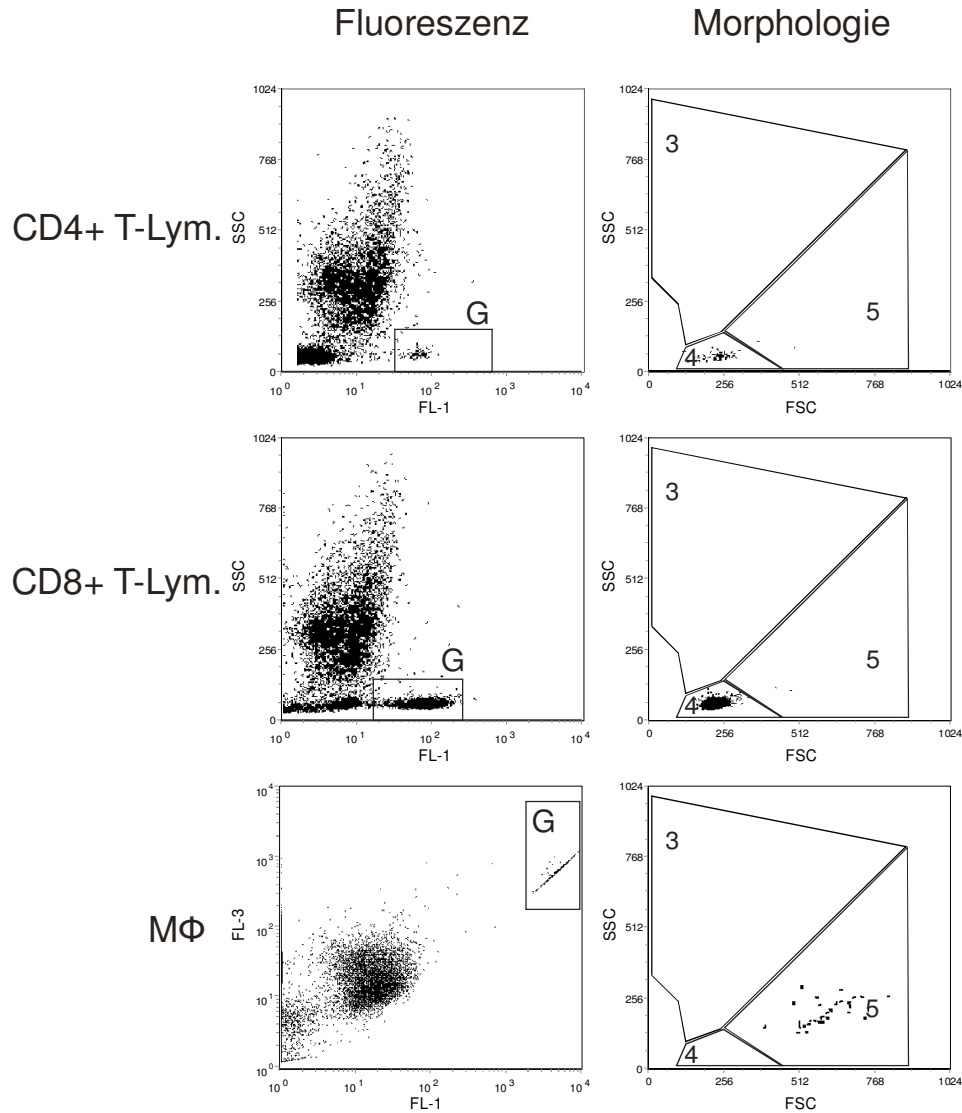
### 3.3.16 Membranimmunfluoreszenz (MIF)

#### 3.3.16.1 Vorbereitung der Milchproben für die Milchezellcharakterisierung mittels Membranimmunfluoreszenz

Von den Viertelgemelken wurden jeweils 25ml Milch in ein steriles 50ml Zentrifugenröhrchen gegeben und gekühlt. Die Milch wurde mit PBS 1:2 verdünnt und bei 400 x g, 10Min. und 4°C ohne Bremse zentrifugiert. Der abgesetzte Rahm wurde anschließend vorsichtig mit dem Spatel vom Gefäßrand gelöst und mittels Wasserstrahlpumpe entfernt. Der flüssige Überstand wurde unter Schonung des Zellpellets dekantiert. Das Zellpellet wurde in 50ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (400 x g, 10Min., 4°C, ohne Bremse). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 800µl PBS resuspendiert und mittels Bürker-Zählkammer die Zellsuspensionsdichte bestimmt. Die Zellsuspensionen wurden auf ca.  $3 \cdot 10^6$  Zellen/ml PBS eingestellt.

### 3.3.16.2 Milchzellcharakterisierung durch Membranimmunfluoreszenz

Die Membranimmunfluoreszenz (MIF) ist ein Verfahren zum Nachweis der Expression von Oberflächenstrukturen auf Zellen. Spezifische Fluorochrom-markierte Antikörper binden hierbei an diese Strukturen. In dieser Arbeit wurde die Methode zur Identifizierung lymphoider Zellen und Makrophagen in der Milch genutzt.



**Abbildung 3: Durchflusszytometrische Bestimmung vitaler lymphoider Zellen und Makrophagen in der Milch nach indirekter Membranimmunfluoreszenz.**

Punktendiagramme nach durchflusszytometrischer Erfassung von 20.000 Ereignissen. Erste Spalte FL-1: (Grünfluoreszenz gegen Komplexität) Identifizierung Fluoreszenz-positiver, Ereignisse (G=Gate). Zweite Spalte FSC: Darstellung der Morphologie (Größe gegen Komplexität). Von den Populationen wird in der zweiten Spalte der Anteil an CD4+-T-Lymphozyten (Lym), CD8+-T-Lymphozyten und Makrophagen (M $\phi$ ) nach direkter Membranimmunfluoreszenz mit spezifischen Primärantikörpern (siehe Tabelle 7) bestimmt. Die Bestimmung des Anteils der jeweiligen Zellpopulation erfolgte durch Setzen eines Fensters (4= Lymphozyten, 5= Makrophagen).

Die Aufarbeitung der Milchzellproben erfolgte auf Eis und unmittelbar nach ihrer Gewinnung. Für die MIF wurden für jeden Antikörperansatz  $3 \cdot 10^5$  Zellen der separierten Zellen in Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte gegeben und bei 260 x g, 4Min. und 4°C mit Bremse zentrifugiert. Die Überstände wurden dekantiert und das Zellpellet auf dem Rüttler resuspendiert. Es folgte ein Waschschrift mit 150µl MIF-Puffer (4°C). Nach Zentrifugation bei 260 x g und 4°C über 4Min. wurden die Zellpellets resuspendiert. Es wurden jeweils 2µl von MouseAntiBovineCD4:FitcAntikörperlösung und MouseAntiHuman-CD14:RPE-AlexaFluor®647Antikörperlösung und 10µl von MouseAntiBovine-CD8BETA:RPE-Antikörperlösung und von MouseAntiSheepMHCclassIIDQDR-Polymorphic:Fitc-Antikörperlösung in die jeweiligen Vertiefungen gegeben und 30Min. bei 4°C auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen 2mal mit 150µl gekühltem MIF-Puffer gewaschen und nach dem Resuspendieren in FCM-Röhrchen überführt, in denen 100µl Trägerflüssigkeit vorgelegt war. Danach erfolgte die durchflusszytometrische Erfassung.

Zunächst wurden die Proben im Seitwärtsstreulicht (SSC) gegen Vorwärtsstreulicht (FSC) erfasst und ein Fenster (*live-gate*) gesetzt, das leukozytäre Zellen anhand ihrer Morphologie definiert. Einzelne Zellsubpopulationen wurden anhand der Grünfluoreszenz im Kanal FL-1 erfasst und relativ quantifiziert. Aus der Verrechnung mit der SCC-Zahl wurden die absoluten Zahlen der einzelnen Zellpopulationen pro ml Milch ermittelt.

Zur Ermittlung der T-Zellsubpopulationen wurde anhand morphologischer Kriterien (in FSC/SSC-Dotplots) die Fraktion der lymphoiden Zellen identifiziert. Unter diesen wurden die Anteile der Zellen bestimmt, die sich mit den Primärantikörpern gegen CD4 und CD8 anfärben ließen (siehe Abbildung 3, Oben, Mitte).

Da bovine PMN in Milch bekanntermaßen wie Makrophagen den LPS-Corezeptor mCD14 exprimieren, mussten Makrophagen in der Milch anhand einer Doppelfärbung dargestellt werden. Als professionelle Antigen-präsentierende Zellen exprimieren sie neben mCD14 ebenfalls MHC Klasse II. Ereignisse, die sich in der MIF für beide Moleküle anfärben ließen, wurden als Makrophagen identifiziert (siehe Abbildung 3, unten).

### 3.3.17 Klinische Labordiagnostik

Das rote Blutbild und das Differentialblutbild wurden im klinischen Labor der Klinik für Wiederkäuer der LMU München angefertigt. Das rote Blutbild wurde mittels eines Sysmex pochH100i angefertigt, für das Differentialblutbild wurde ein Blutausschrieb nach Pappenheim gefärbt und mikroskopisch differenziert. Die Tiere wurden zunächst unmittelbar nach der Aufstallung untersucht. Das Blutbild wurde zu den Stunden 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 120, 168, 240, 246, 249, 252, 264, 288, 312, 372, 444, 516, 636, 756 und 876 (je nach Versuchsdauer) untersucht.

### 3.3.18 Progesteron- und Östrogenbestimmung

#### *Progesteronbestimmung im Blutplasma*

Für die Untersuchung des zyklusabhängigen Milchzellgehalts wurde im Hormon-Labor der Klinik für Wiederkäuer der Gehalt an Progesteron im Blutplasma bestimmt. Durchgeführt wurde dies mit einem Enzym-Immuno-Assay wie bei Prakash et al. (1987) beschrieben<sup>298</sup>. Das Hormonprofil wurde zu den Stunden 0, 24, 48, 72, 120, 168, 240, 264, 288, 312, 372, 444, 516, 636, 756 und 876 je nach Dauer des Versuchs untersucht. Zum Einsatz kam ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Antigen: Progesteron-7α-BSA; Marker: Progesteron-6β-

HRP). Die Nachweisgrenze der Progesteronmessung „signifikant verschieden zu 0“ war 0,2pg pro Well. Alle Intra- and Interassayvariationen waren < 9,5%.

#### *Gesamtöstrogenbestimmung im Blutplasma*

Die Bestimmung des Gesamtöstrogengehaltes im Blutplasma erfolgte nach Hydrolyse (0,4% Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia*) und Ether-Extraktion nach der von Meyer et al. (1997) beschriebenen Methode mittels eines Enzym-Immuno-Assays (EIA)<sup>299</sup>. Zum Einsatz kam ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Antigen: 17 $\beta$ -Estradiol-17HS-BSA; Marker: 17 $\beta$ -Estradiol-17HS-HRP. Die Intra-Assay-Variation betrug 12%. Die Nachweisgrenze der Östrogenmessung „signifikant verschieden zu 0“ lag bei 0,03pmol/ml.

### **3.3.19 Gewinnung von venösem Blut**

Das Blut wurde durch Punktion der *Vena jugularis* unter antiseptischen Kautelen nach Fixierung des Tieres und manueller Stauung des Gefäßes gewonnen. Zur Blutentnahme wurde das Vacutainersystem mit EDTA-gerinnungshemmenden Vacutainern für die Gewinnung von Blutleukozyten und Blutplasma eingesetzt.

### **3.3.20 Gewinnung von Plasma aus peripherem Blut**

Das mit EDTA-Vacutainern entnommene Blut wurde bei Raumtemperatur 10Min. stehengelassen. Die Röhrchen wurden anschließend bei 2000 x g über 10Min. bei Raumtemperatur mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand (Plasma) wurde vorsichtig mit einer Eppendorfpipette abgesaugt. Dabei war zu beachten, dass der Blutkuchen nicht aufgeschwemmt wurde. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das Plasma bei 4°C kühl gehalten oder bei -20°C eingefroren.

### **3.3.21 Statistische Verfahren**

Die Daten wurden mit Excel (Microsoft), Origin (version 8) und SAS (version 9.1) ausgewertet.

Die Zellzahlen der Milch (logarithmierte Werte, um Normalverteilung zu erhalten) wurden mittels Mixed Model (Proc Mixed in SAS) ausgewertet, dabei wurde für wiederholte Messungen korrigiert und das Tier als zufälliger Effekt eingegeben.

Die Differenz der Milchmenge auf Viertelebene während des Zyklus war normalverteilt und wurde in einem gepaarten t-Test auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Tagen getestet. Die Differenzen der Blutlymphozytenzahlen zwischen den verschiedenen Tagen wurden mittels des nichtparametrischen Wilcoxon-Tests getestet. Mit derselben Methode wurde auch das Verhältnis der CD4+/CD8+-Zellen über die verschiedenen Messzeitpunkte überprüft.

Unterschiede zwischen den drei Gruppen („no priming“, „72h priming“ und „10d priming“) in verschiedenen Parametern, die nicht normal verteilt waren, wurden mittels dem nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Test (z.B. Differenz der Milchmenge in infizierten und nicht infizierten Vierteln; SCC) getestet. Als nachfolgende Tests wurde der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt oder mit einer ANOVA mit Tukey-post-hoc-Test überprüft (falls die Daten normal verteilt waren, wie z.B. die Körpertemperatur, Differenz der Leukozyten).

Kategorische Daten (die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung) wurden mittels Chi-Quadrat-Test auf Signifikanz getestet. Als statistisch signifikant wurden p-Werte von  $\leq 0,05$

gewertet.

Einige Daten werden im Ergebnisteil in Form von Boxplots dargestellt. Der Boxchart dient der Darstellung statistischer Auswertungen der Messwertverteilung. Abbildung 4 zeigt einen symbolischen Boxchart zur Erläuterung. Das untere Kreuz zeigt den Minimalwert an und das untere Ende der vertikalen Linie bezeichnet die 5%-Grenze. Die untere Begrenzung der Box markiert die 25%-, die mittlere Linie die 50%- und die obere Begrenzung die 75%-Grenze. Innerhalb der Box liegen also 50% aller gemessenen Werte. Das Quadrat gibt das arithmetische Mittel aller Messwerte an. Das obere Ende der vertikalen Linie bezeichnet die 95%-Grenze. Das obere Kreuz zeigt den maximalen Messwert an.  $\bar{x}$  55 (20-65) im Textteil bedeutet Median 55, 1. Quartil 20 und 3. Quartil 65.

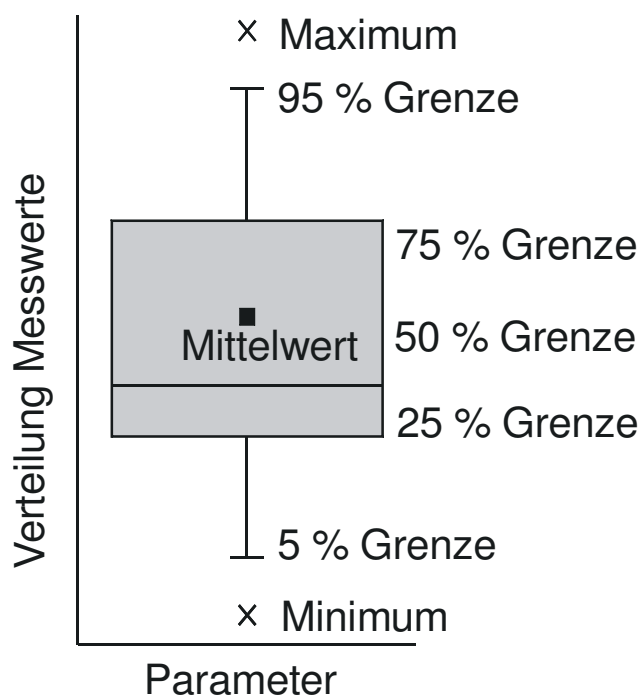


Abbildung 4: Exemplarischer Aufbau eines Boxcharts mit statistischen Kennzahlen.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Etablierung eines Tiermodells zur Untersuchung der mammären Endotoxintoleranz

#### 4.1.1 Versuche zur Dosisfindung für LPS zur intramammären Anwendung

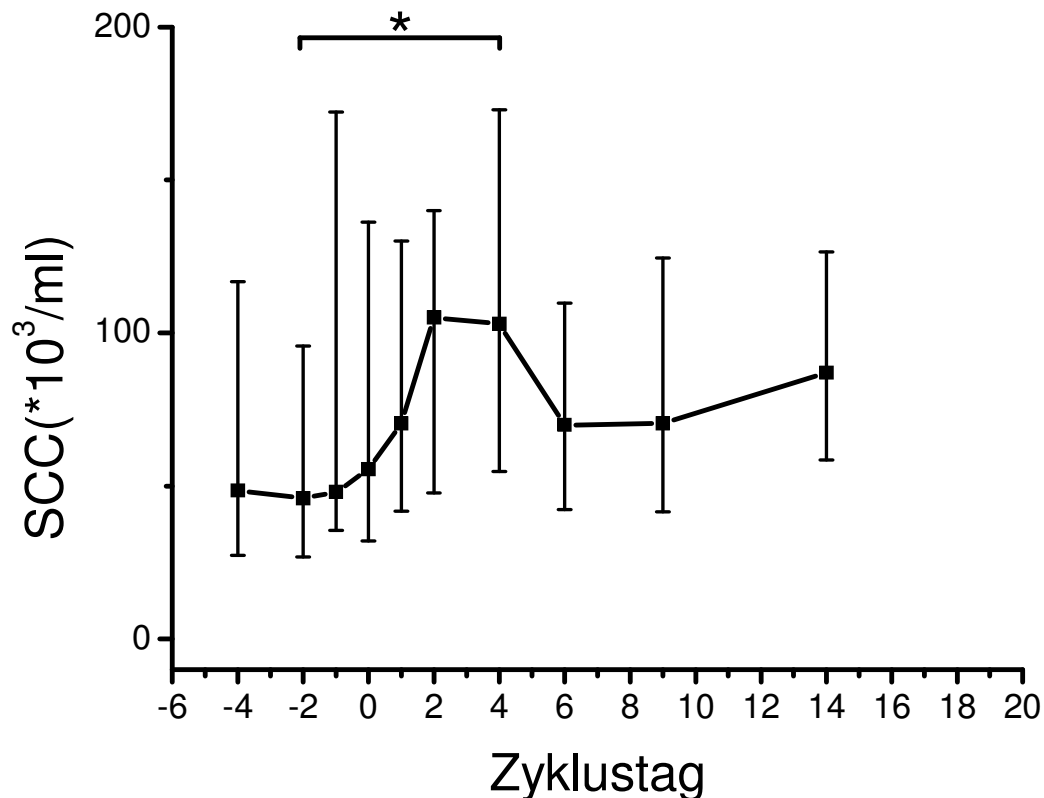
Eine Dosis von 100µg LPS/Euterviertel wurde sehr häufig in experimentellen Versuchen zur Nachahmung einer *E. coli*-Mastitis angewendet. Die intramammäre Gabe von 100µg LPS löst kurzzeitig Symptome einer schweren Mastitis mit Fieber, sistierender Futteraufnahme, Pansenatonie und schweren lokalen Entzündungssymptomen am Euter aus (<sup>13</sup>; siehe auch 2.1). Unser Ziel in dieser Studie war es, die Auswirkungen der LPS-Inokulation auf die Kuh möglichst gering zu halten und dennoch einen Effekt des „LPS-Primings“ zu erzielen. Aus diesem Grund wurde zunächst über Vorversuche ein geeigneter Dosierungsbereich ermittelt: Initial wurden einer Kuh 100ng LPS, gelöst in 5ml steriler 0,9%iger NaCl-Lösung, in ein Euterviertel infundiert. Das behandelte Tier zeigte 8 - 10h nach der Infusion eine geringgradige Erhöhung der Körpertemperatur von 38,4°C auf 38,9°C. Klinisch zeigte das Euter eine geringgradige Induration im Parenchym sowie eine einzelne Eiterflocke im Viertelanfangsgemelk 24h und 36h nach LPS-Gabe. Der Zellgehalt der Milch stieg im behandelten Viertel von einem Ausgangszellgehalt von  $3 \cdot 10^4$  Zellen/ml (0h) auf  $8 \cdot 10^5$  Zellen/ml (12h) an. Bereits nach 24h fiel der Zellgehalt kontinuierlich ab und erreichte Werte  $< 1 \cdot 10^5$  Zellen/ml nach 120h. Die Milchleistung blieb unverändert. Ein deutlicherer Effekt war nach Erhöhung der Dosis um den Faktor 10 auf 1µg LPS zu sehen: Dies zeigte sich lediglich in einem stärkeren Anstieg des Zellgehalts auf  $4 \cdot 10^6$  Zellen/ml Milch. Trotz des deutlichen lokalen Einstroms von Entzündungszellen war ein Anstieg der Körpertemperatur als systemische Auswirkung von LPS nicht festzustellen. Eine Störung des Allgemeinbefindens sowie Milchleistungseinbußen blieben aus. Da weitere Vorversuche (n=5) bei gleicher Dosierung das Ergebnis bestätigten, wurden nachfolgende Versuche mit der Dosis von 1µg LPS, gelöst in 5ml 0,9%iger NaCl-Lösung, durchgeführt.

#### 4.1.2 Versuche zur Abhängigkeit des Zellgehalts vom Zyklusstand des Rindes

Zur Optimierung eines bereits in der Arbeitsgruppe etablierten *in vivo*-Infektionsmodells<sup>297</sup> sollte geprüft werden, inwieweit der weibliche Sexualzyklus Auswirkungen auf immunologische Parameter der Milchdrüse hat. Hierzu liegen aus der Literatur widersprüchliche Aussagen vor: Guildry et al. (1975) sahen keinen Effekt auf die Milchzellzahl nach Injektion von Östradiol-17β<sup>300</sup>, während King (1977) von erhöhten Zellgehalten im Östrus berichtete<sup>301</sup>. Cowan et al. (1978) fanden keinen zyklusabhängigen Effekt auf den Zellgehalt erstlaktierender Kühe<sup>302</sup>. Zwei Tiere mit einem höheren Ausgangszellgehalt reagierten jedoch mit einer weiteren Erhöhung des Zellgehaltes an den Tagen 3 bis 5 im Zyklus.

Aufgrund dieser z.T. widersprüchlichen Ergebnisse führten wir eigens einen Versuch durch, bei dem wir 11 Milchkühe mit durchschnittlichem bis niedrigem Ausgangszellgehalt ( $6-780 \cdot 10^3$  Zellen/ml) einer Zyklussynchronisation unterzogen (siehe 3.2.1). Anschließend verfolgten wir den Milchzellgehalt über einen Zyklus hinweg. Der Zyklustag der Kuh hatte einen signifikanten Effekt auf den Milchzellgehalt ( $p < 0,01$ ). Im paarweisen Vergleich mit Bonferroni-Korrektur unterschieden sich jedoch nur Tag 4 und Tag -2 (siehe Abbildung 5; Östrus = Tag 0). Die absolute Höhe des Zellgehaltes hatte dabei keinen Einfluss auf die

Dynamik des Zellgehaltes im Zyklus (siehe Abbildung 5). Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass der Östrustag keinen erhöhenden Einfluss auf den Zellgehalt der Kuh hat und ein signifikanter Anstieg des Zellgehalts nur im Metöstrus festzustellen ist. Da es offensichtlich zyklusbedingte Einflüsse auf immunologische Parameter im Euter gibt, wurden zur Standardisierung des Tiermodells die Tiere im Folgenden so synchronisiert, dass der Tag der Infektion mit dem Östrus zusammenfiel und somit alle Probanden mit gleichen Voraussetzungen im Infektionsversuch starteten.



**Abbildung 5: Milchzellzahl in Abhängigkeit vom Sexualzyklus**

Dargestellt ist die Entwicklung des somatischen Zellgehalts (SCC) (Mediane  $[\tilde{x}] \pm 1.$  und 3. Quartil) in Viertelgemelksproben ( $n=44$ ) von 11 Tieren über einen Zyklus (21d). Am Tag 0 befanden sich alle Tiere im Östrus. \*  $p<0,01$

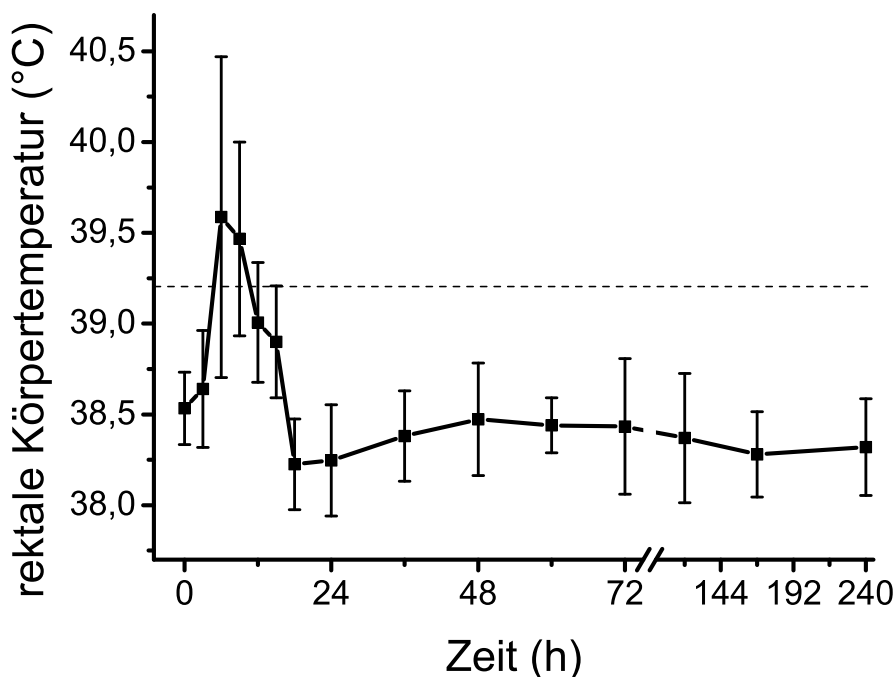
#### 4.2 Systemische und lokale Effekte der intramammären Inokulation von LPS

Mit der intramammären Gabe von LPS lässt sich dosisabhängig eine sterile entzündliche Reaktion erzeugen. Bei hoher Dosierung reagiert die Kuh lokal und systemisch ähnlich wie bei einer natürlichen Infektion mit *E. coli*. Eine geringe Dosierung hingegen führt lediglich zu einer lokal begrenzten immunologischen Reaktion auf einen nichtinfektiösen Erregerbestandteil. Dies sollte in einem protektiven Sinne ausgenutzt werden, um die Milchdrüse auf eine folgende Infektion mit dem infektiösen Erreger vorzubereiten („Priming“). Als Dosis wurden 1µg LPS, gelöst in 5ml steriler 0,9%iger NaCl-Lösung, pro

Euterviertel eingesetzt (siehe 4.1.1). Im Folgenden sind die messbaren Auswirkungen der LPS-Inokulation *in vivo* dargestellt.

#### 4.2.1 Rektale Körpertemperatur

Während der ersten 18h der „Primingphase“ wurde die rektale Körpertemperatur alle 3h, danach im 12-stündigen Abstand überwacht. Alle Tiere (n=15) zeigten eine Erhöhung der Körpertemperatur (siehe Abbildung 6), wobei bei zwei Tieren die Fiebergrenze von 39,2°C nicht überschritten wurde. Das Temperaturmaximum wurde zwischen Stunde 6 und Stunde 12 erreicht und lag bei durchschnittlich  $40,0 \pm 0,59^\circ\text{C}$ . Zur Stunde 24 lag die Temperatur bei allen Tieren wieder im Normalbereich und stieg nicht wieder an (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6: Verlauf der rektalen Körpertemperatur nach intramammärer Inokulation von LPS**

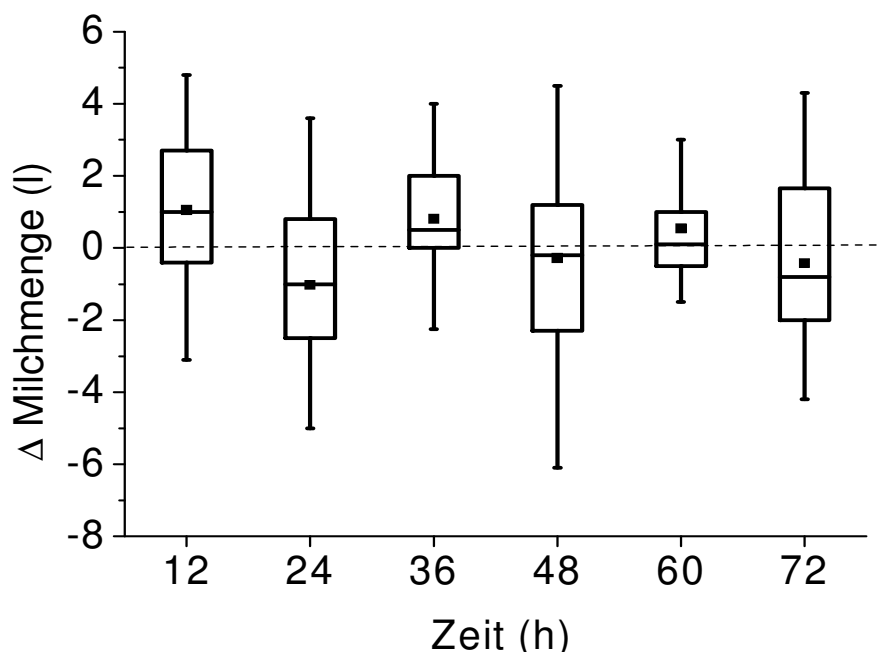
Dargestellt ist der Verlauf der Körpertemperatur ( $\bar{x} \pm \text{Stabw.}$ ) nach intramammärer Inokulation von  $1\mu\text{g}$  LPS in alle vier Euterviertel zur Stunde 0. Bis Stunde 72 beträgt die Tierzahl n=15, ab Stunde 86 bis Stunde 240 n=10.

#### 4.2.2 Allgemeine klinische Symptome

Innerhalb der ersten 18h nach LPS-Inokulation wurde bei den Versuchstieren Haltung, Verhalten, Schleimhautfarbe, Herzfrequenz sowie Futteraufnahme und Pansenmotorik alle 3h dokumentiert (siehe 3.3.9). Während der „Primingphase“ war in diesen Parametern bei keinem Tier eine Abweichung von physiologischen Werten festzustellen.

### 4.2.3 Milchleistung

Die Milchleistung wurde während des Versuchs auf Viertelebene gemessen. Vor dem Versuch wurde die Leistung als gesamte Milchmenge pro Melkzeit zweimal täglich aufgezeichnet. Die Entwicklung der Milchleistung nach dem „Priming“ wurde folgendermaßen dargestellt: Als Ausgangswerte wurden die Mittelwerte der Milchleistungen aus den dem Versuchsbeginn vorausgehenden fünf Morgengemelken ( $\bar{x} 15,6 \pm 2,6l$ ) und Abendgemelken ( $\bar{x} 12,2 \pm 2,1l$ ) berechnet. Anschließend wurde innerhalb des Versuchs die Differenz der Abendgemelke zum Durchschnitt der Abendgemelke und die Differenz der Morgengemelke zum Durchschnitt der vorausgehenden Morgengemelke errechnet. Abbildung 7 zeigt die Entwicklung der Milchmenge nach dem Priming. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Milchmenge zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach LPS-Inokulation im Vergleich zu den Ausgangswerten festgestellt werden. Schwankungen in der Milchleistung entsprachen normalen Tagesschwankungen.

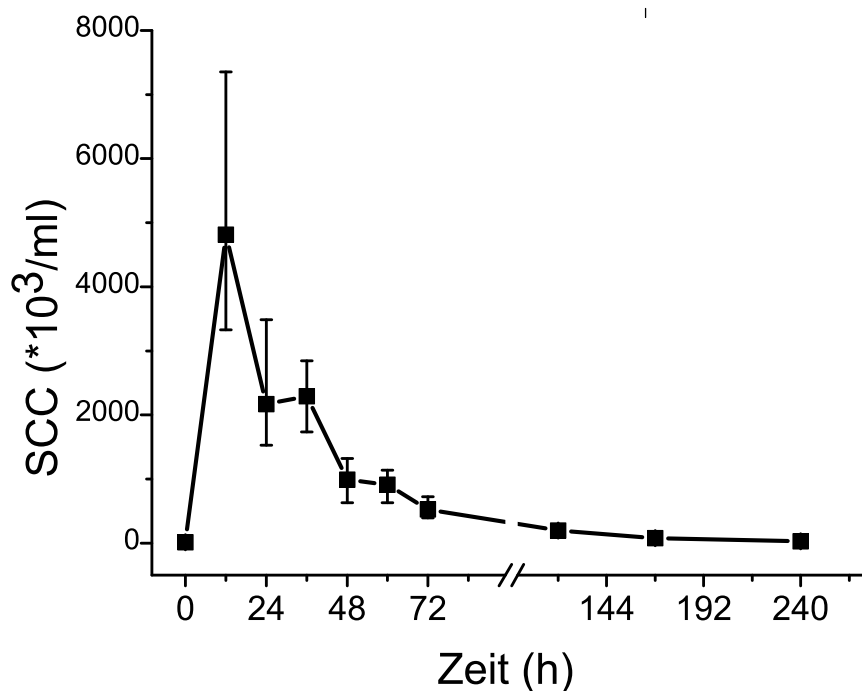


**Abbildung 7: Veränderung der Milchleistung nach intramammärer LPS-Inokulation**

Dargestellt ist die Differenz ( $\Delta$ ) der Milchmenge auf Viertelebene ( $\tilde{x} \pm 1.$  und 3. Quartil) der Versuchstiere ( $n=15$ ) in den ersten 72h nach LPS-Inokulation. Die Werte beziehen sich auf jeweilige Durchschnittsmengen der vorausgegangenen 5d. Es wurde der Mittelwert der Milchleistungen der Abendgemelke der letzten 5d vor dem Versuch ( $\bar{x} 12,2 \pm 2,1l$ ) und der Mittelwert der Morgengemelke der letzten 5d vor dem Versuch ( $\bar{x} 15,6 \pm 2,6l$ ) errechnet. Daraufhin wurden jeweils der Durchschnitt der Abendgemelke von der Milchleistung von 12, 36 und 60h und der Durchschnitt der Morgengemelke von 24, 48 und 72h abgezogen. Positive Werte stellen also höhere Milchleistungen zu Zeitpunkten nach dem „Priming“ verglichen mit den Referenzzeitpunkten und negative Werte niedrigere Milchmengen zu den Zeitpunkten nach der LPS-Inokulation dar. Boxplots: Median (—); MW (▪); Interquartilbereich (Box), 5. (⊥), 95. (⊤) Perzentil.

#### 4.2.4 SCC der Milch nach LPS-Inokulation

Zu den Zeitpunkten 0h sowie 12h, 24h, 36h, 48h, 72h, 120h, 168h und 240h nach der LPS-Inokulation wurde der SCC des Gesamtgemelks auf Viertelebene bestimmt (siehe 3.3.8). Der Ausgangszellgehalt der Viertelgemelke lag wie im Tiermodell gefordert unter  $5 \cdot 10^4$  Zellen/ml Milch und betrug im Schnitt  $\tilde{x}$   $1,4 (0,9-2,5) \cdot 10^4$ /ml. Höchste SCC-Werte von  $\tilde{x}$   $4,8 (3,3-7,4) \cdot 10^6$ /ml wurden in allen „geprimten“ Vierteln 12h nach LPS-Infusion gemessen (siehe Abbildung 8). Anschließend verringerte sich der Zellgehalt kontinuierlich wieder auf ein Niveau von  $\tilde{x}$   $5,3 (3,9-7,2) \cdot 10^5$  Zellen/ml Milch zur Stunde 72 und lag 10d nach dem „Priming“ wieder bei  $\tilde{x}$   $2,9 (2,1-4,8) \cdot 10^4$  Zellen/ml Milch und damit annähernd wieder bei den Ausgangszellgehalten (siehe Abbildung 8).



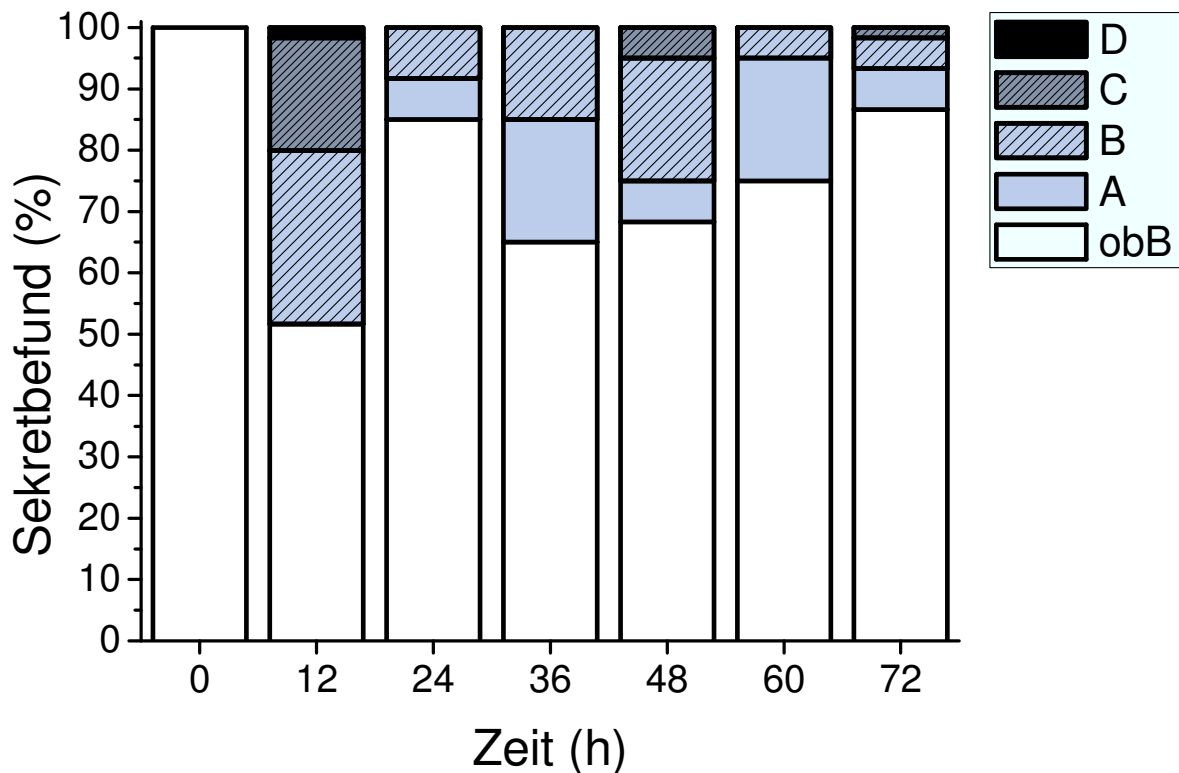
**Abbildung 8: Entwicklung der Somatischen Zellzahl (SCC) nach intramammärer LPS-Infusion**

Dargestellt ist der SCC ( $\tilde{x} \pm 1.$  und  $3.$  Quartil) aus Viertelgemelken von 15 Tieren bis 72h bzw. von 10 Tieren bis 240h nach Inokulation von  $1 \mu\text{g}$  LPS pro Euterviertel zum Zeitpunkt 0h.

#### 4.2.5 Sekretveränderungen nach intramammärer LPS-Inokulation

Während des Versuchs wurde jeweils die Sekretbeschaffenheit der Viertelanzgangsgemelke beurteilt (siehe 3.3.10.3). Die Veränderungen, ausgedrückt in Prozent der zum jeweiligen Zeitpunkt beurteilten Sekrete, sind in Abbildung 9 dargestellt. Zu Versuchsbeginn zeigten alle Viertel eine ungestörte Sekretion. Zum Zeitpunkt 12h zeigten 50% der Viertelgemelke vorübergehend geringgradige bis mittelgradige Veränderungen der Sekretbeschaffenheit (Flockenbildung). Bereits 24h nach der LPS-Infusion war nur noch in ca. 10% der Viertel Flockenbildung im Sekret feststellbar. Nach dem Zeitpunkt 72h konnten keine

makroskopischen Veränderungen im Milchsekret mehr festgestellt werden.

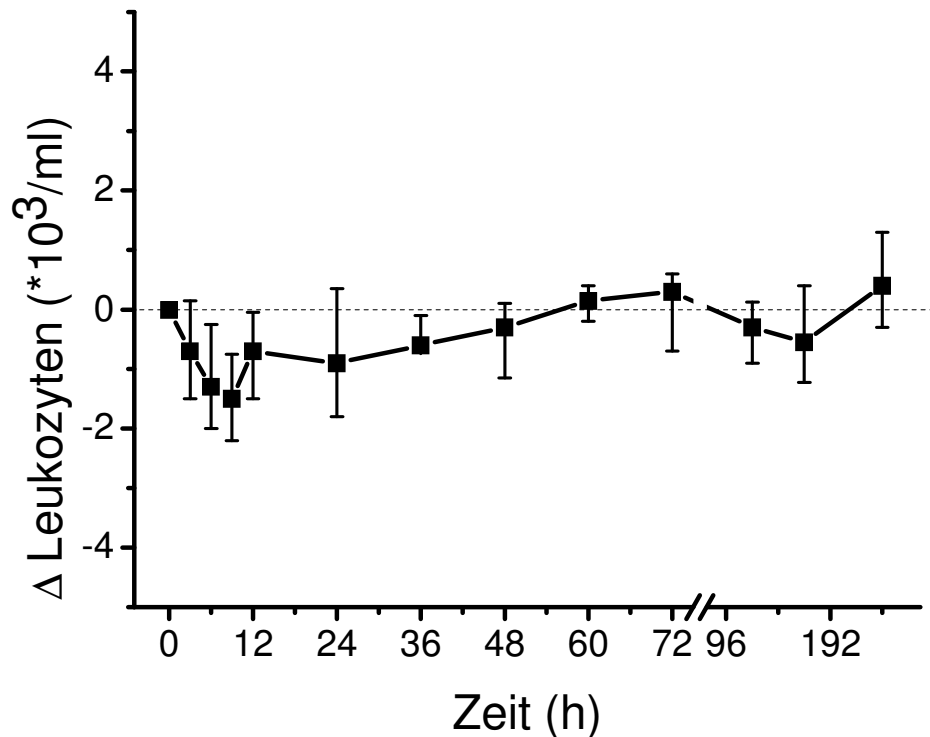


**Abbildung 9: Veränderungen des Milchsekrets nach intramammärer LPS-Inokulation**

Dargestellt sind der prozentuale Anteil von Eutervierteln mit veränderter Sekretbeschaffenheit zum Zeitpunkt 0-72h (n=60) und 84-240h (n=40) post infectionem. o.b.B.=keine makroskopischen Veränderungen, A=Milchcharakter erhalten, wässrig ohne Flocken, B= Milchcharakter erhalten, wässrig mit kleinen Flocken, C= Milchcharakter erhalten, einige grobe Flocken, D= Milchcharakter erhalten, viele grobe Flocken.

#### 4.2.6 Blutbild

Um mögliche systemische Auswirkungen der Inokulation von LPS ins Euter zu erfassen, wurde bei allen Versuchstieren der Gehalt an zirkulierenden Leukozyten im venösen Blut gemessen. Als Ausgangswert zeigten die Tiere stark individuell unterschiedliche Leukozytenghalte im Blut (Max.:  $9 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  Min.:  $3,3 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ ,  $\bar{x}$  von 7 ( $5,5-7,6$ )  $\cdot 10^3$  Zellen/ $\mu\text{l}$ ). Im Verlauf des Versuchs fiel der Leukozytengehalt um durchschnittlich  $1,8 \pm 1,2 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  und erreichte niedrigste Werte zur Stunde 9 nach LPS-Inokulation. Anschließend stiegen die Leukozytenghalte wieder an und erreichten ihre Ausgangswerte wieder nach 72h (siehe Abbildung 10). Bis zum letzten gemessenen Wert nach 240h ergaben sich keine signifikanten Veränderungen mehr. Bei der statistischen Überprüfung der Veränderungen des Leukozytenghalts nach der LPS-Inokulation erwiesen sich die Differenzen zu den einzelnen Zeitpunkten als nicht signifikant.



**Abbildung 10: Veränderung des Blut-Leukozytengehalts nach intramammärer LPS-Inokulation**

Dargestellt ist die Differenz ( $\Delta$ ) der Leukozytenghalte im Blut ( $\bar{x} \pm 1.$  und 3 Quartil) in Leukozyten  $\cdot 10^3/\mu\text{l}$  zu den beprobten Zeitpunkten nach der LPS-Infusion = Zeitpunkt 0h. Von den Werten zum jeweiligen Zeitpunkt wurde der Ausgangswert (0h) subtrahiert. Positive Werte stellen höhere Gehalte, negative Werte niedrigere als zu Versuchsbeginn dar. Bis zur Stunde 72 beträgt die Tierzahl  $n=15$ , bis zur Stunde 240  $n=10$ .

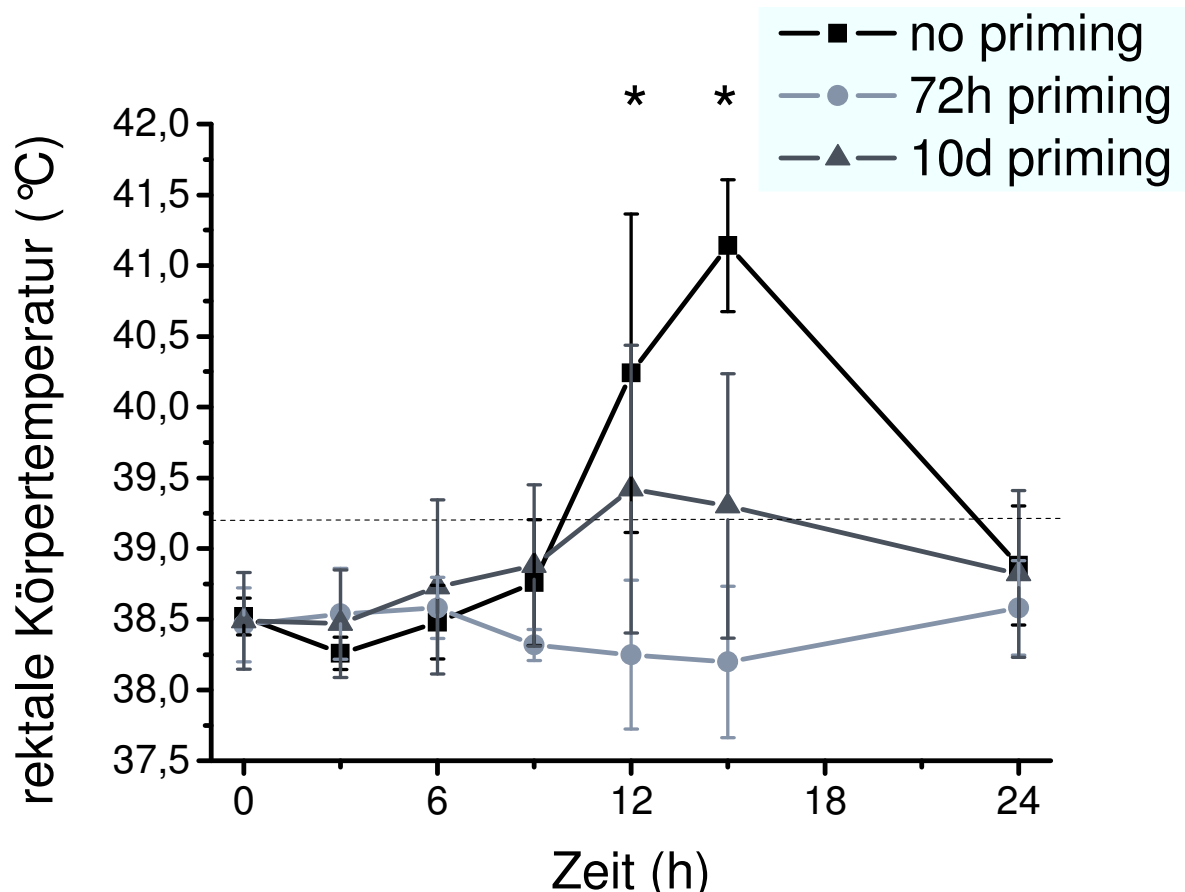
### 4.3 Einfluß einer intramammären LPS-Vorbehandlung („Priming“) auf die Etablierung einer experimentellen Mastitis durch *E. coli*

Um Effekte des „LPS-Primings“ auf eine experimentelle Infektion mit *E. coli* in der bovinen Milchdrüse zu untersuchen, wurden 3 Versuchsgruppen gebildet: *E. coli*-Infektion 72h nach Inokulation (Gruppe „72h priming“), *E. coli*-Infektion 10d nach Inokulation (Gruppe „10d priming“) und *E. coli*-Infektion ohne Inokulation (Gruppe „no priming“). Die Gruppen wurden jeweils auf einem Euterviertel mit *E. coli* experimentell infiziert entweder 72h oder 10d nach LPS-Inokulation oder ohne jegliche Vorbehandlung.

#### 4.3.1 Rektale Körpertemperatur

In Abbildung 11 sind die Mittelwerte ( $\bar{x}$ )  $\pm$  Standardabweichungen der Temperaturdynamik in den ersten 24h nach der Infektion mit *E. coli* dargestellt. Die Kontrollgruppe „no priming“ zeigt bereits 9h nach der Inokulation von *E. coli* ein Ansteigen der Temperatur. Zum Zeitpunkt 15h lag das Temperaturmaximum bei  $\bar{x} 41,1 \pm 0,5^\circ\text{C}$  (siehe Abbildung 11). Tiere,

die 10d nach der intramammären LPS-Infusion mit *E. coli* infiziert wurden („10d priming“), zeigten nur z.T. einen Anstieg der Körpertemperatur (5 von 10 Tieren). Die Kurve der Mittelwerte zeigte zu Beginn eine ähnliche Dynamik wie die Kurve der nicht „geprimten“ Tiere mit ebenfalls einem Temperaturanstieg ab 9h post infectionem (p. inf.). Im Gegensatz zur Kontrollgruppe war das Maximum aber schon beim Zeitpunkt 12h p. inf. erreicht und mit  $\bar{x} 39,4 \pm 1,0^\circ\text{C}$  signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 11). Von den Tieren, die 72h nach der LPS-Infusion mit *E. coli* infiziert wurden („72h priming“), zeigte keines der Tiere eine Erhöhung der Körpertemperatur.



**Abbildung 11: Dynamik der Körpertemperatur nach experimentell induzierter *E. coli*-Mastitis**

Dargestellt sind Temperaturverläufe ( $\bar{x} \pm \text{Stabw.}$ ) der Kontrolltiere („no priming“, n=5), der Tiere die 72h nach „LPS-Priming“ infiziert wurden („72h priming“, n=5) und der Tiere, die 10d nach dem „Priming“ infiziert wurden („10d priming“, n=10). Die *E. coli*-Infektion erfolgte zur Stunde 0. \* Es besteht jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen „geprimter“ Tiere zu den Kontrolltieren ( $p < 0,001$ ). Anova für 3 Gruppen mit Tukey Post-Hoc-Test für paarweise Vergleiche.

Zwischen Kontrolltieren und „geprimten“ Tieren bestanden jeweils signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) zur Stunde 12 und 15 nach experimenteller *E. coli* Infektion. Aufgrund der hohen interindividuellen Schwankungen in der über 10d „geprimten“ Gruppe war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden „geprimten“ Gruppen festzustellen ( $p > 0,05$ ).

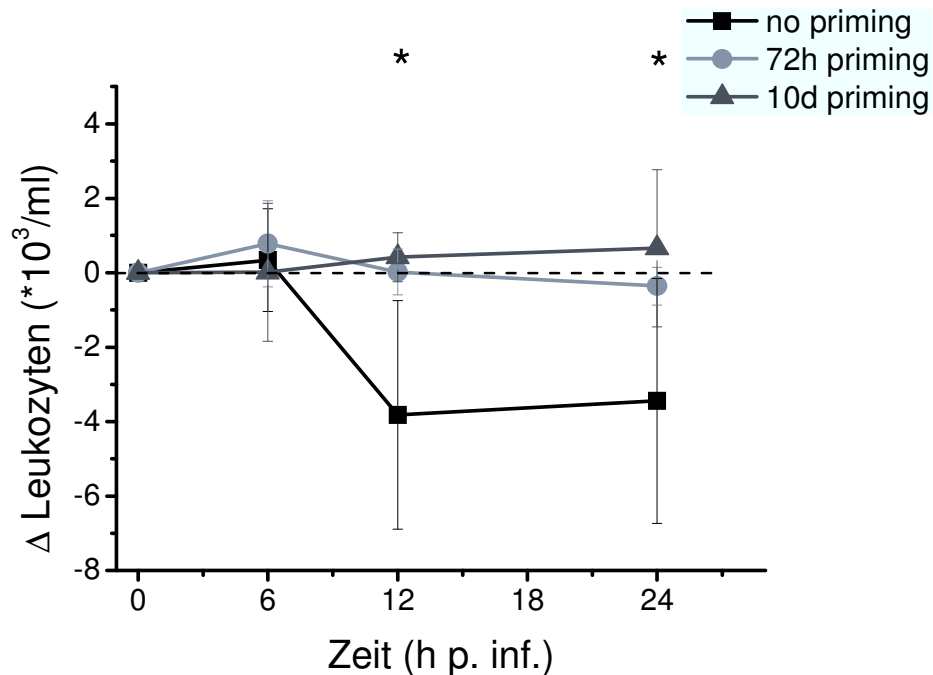


### 4.3.2 Allgemeine klinische Symptome

Während des Versuchs wurden zur Einschätzung des Schweregrads der Mastitis zu den oben beschriebenen Zeitpunkten die Futtermaufnahme, Haltung und Verhalten, Herzfrequenz, Pansenmotorik und Schleimhautfarbe aufgezeichnet (siehe 3.3.9). In der Gruppe „no priming“ zeigten alle Tiere 12h p. inf. ein gestörtes Allgemeinbefinden. Die Futtermaufnahme nahm bei allen 5 Tieren 12h p. inf. stark ab oder sistierte für ca. 2-3h, die Pansenmotorik als auch die sensomotorische Erregbarkeit (Verhalten) waren geringgradig bis mittelgradig reduziert. Die Herzfrequenz sowie die Farbe der Schleimhäute blieben unverändert und die Episkleralgefäße waren fein gezeichnet. Der Allgemeinzustand war insgesamt mittelgradig gestört, es traten aber keinerlei Anzeichen einer Sepsis auf.

In den Gruppen „10d priming“ und „72h priming“ zeigte kein Tier Störungen des Allgemeinbefindens. Alle Tiere zeigten normale Futtermaufnahme und physiologische Werte der untersuchten klinischen Parameter (siehe oben) während des gesamten Versuchszeitraums.

### 4.3.3 Blutbild



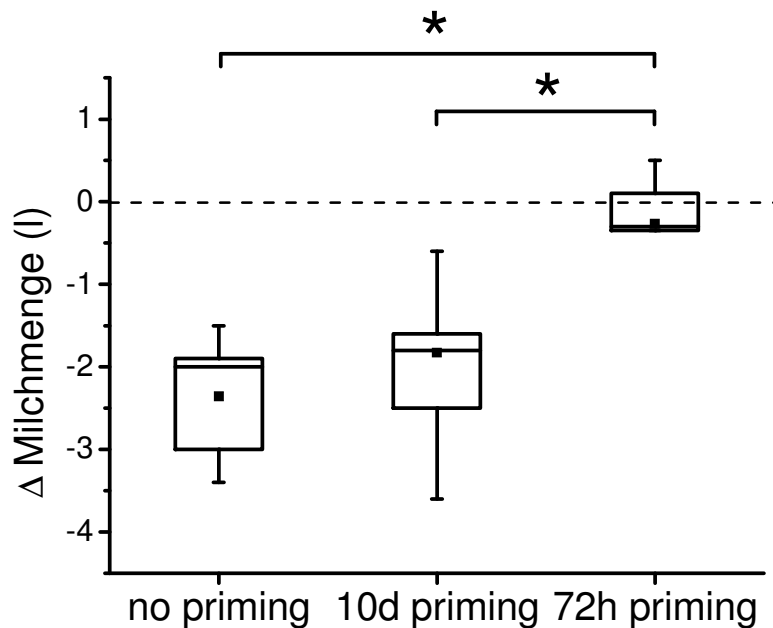
**Abbildung 12: Entwicklung der Leukozytenzahl im Blut bei experimenteller Mastitis mit *E. coli***

Dargestellt ist der Verlauf der Mittelwerte der Differenzen ( $\Delta$ )  $\pm$  Stabw. der Leukozytenghalte im Blut ab Stunde 0 (Zeitpunkt der Infektion). Negative Werte bedeuten eine Abnahme des Leukozytengehalts im Blut, positive Werte eine Zunahme des Leukozytengehalts. Die Anzahl der Tiere beträgt bei der Kontrollgruppe („no priming“) und der 72h nach „LPS-Priming“ infizierten Gruppe („72h priming“) jeweils n=5 und bei der 10d nach „LPS-Priming“ infizierten Gruppe („10d priming“) n=10.\*p<0,01

Um die möglichen systemischen Auswirkungen der sich etablierenden *E. coli*-Mastitis zu

erfassen, wurde bei allen Versuchstieren der Gehalt an zirkulierenden Leukozyten im venösen Blut während des Infektionsverlaufs gemessen. Beide geprimten Gruppen („72h priming“, „10d priming“) zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen der Leukozytengehalte im Blut. In der Kontrollgruppe („no priming“) hingegen konnte bereits 12h nach Pathogen-Inokulation eine deutliche, statistisch signifikante Leukopenie festgestellt werden ( $p < 0,01$ ), die auch weitere 12h anhielt ( $p < 0,01$ ; siehe Abbildung 12).

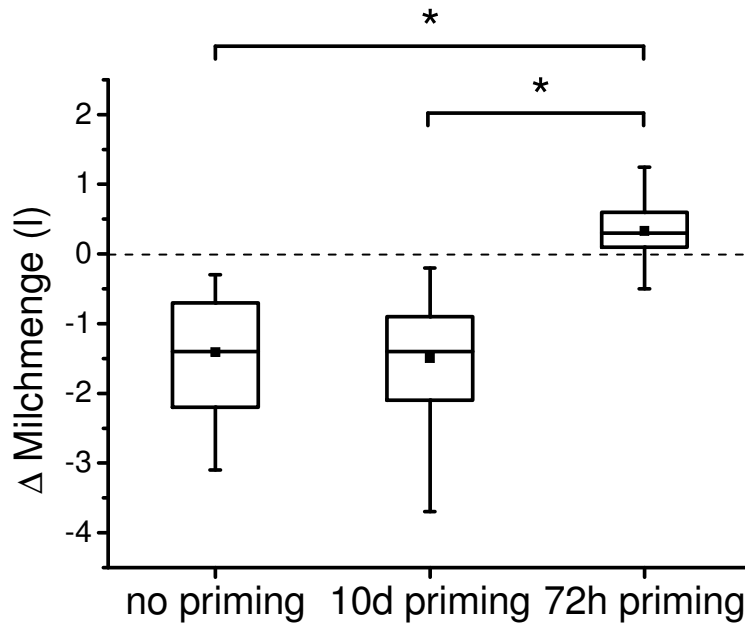
#### 4.3.4 Milchleistung



**Abbildung 13: Entwicklung der Milchleistung 24h nach der Infektion mit *E. coli***

Dargestellt ist der Abfall der Milchleistung im infizierten Viertel 24h p. inf. vergleichend bei den Kontrolltieren mit *E. coli*-Infektion ohne „Priming“ („no priming“; n=5), den Tieren mit „LPS-Priming“ 72h vor Infektion („72h priming“; n=5) und bei der Gruppe mit „LPS-Priming“ 10d vor der Infektion („10d priming“; n=10) als Boxplots. Verglichen wurde dabei die Milchleistung auf dem infizierten Viertel mit dem Durchschnitt der letzten 5 Morgengemelke vor der Infektion. Boxplots: Median (—); MW (▪); Interquartilbereich (Box), 5. (⊥), 95. (⊓) Perzentil.

Während des Versuchs wurden die Tiere mit einer Viertelmelkmaschine gemolken; d.h. dass bei der Auswertung zwischen infizierten und nicht infizierten Vierteln unterschieden werden konnte. Auf den infizierten Vierteln zeigten nicht vorbehandelte Tiere einen Abfall der Milchleistung um  $\tilde{x}$  2 (1,9-3)l (siehe Abbildung 13). Bei den Tieren der Gruppe „10d priming“ sank die Milchleistung auf dem infizierten Viertel 24h nach der Infektion um  $\tilde{x}$  1,8 (1,6-2,4)l, bei der „72h priming“-Gruppe um  $\tilde{x}$  0,3 (-0,1-0,4)l. Bei der statistischen Auswertung ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe „no priming“ und „72h priming“ ( $p < 0,01$ ) sowie „72h priming“ und „10d priming“ ( $p < 0,01$ ). Es war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den „10d priming“-Tieren in der Milchleistung auf den infizierten Vierteln nachweisbar (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 14: Entwicklung der Milchleistung auf den nicht infizierten Vierteln 24h nach Infektion mit *E. coli***

Dargestellt ist der Abfall der Milchleistung in den nicht infizierten Vierteln p. inf. vergleichend bei den Kontrolltieren mit *E. coli*-Infektion ohne „LPS-Priming“ („no priming“; n=15), den Tieren mit „LPS-Priming“ 72h vor Infektion („72h priming“; n=15) und bei der Gruppe mit „LPS-Priming“ 10d vor der Infektion („10d priming“; n=30) in l als Boxplots. Verglichen wurde dabei die Milchleistung auf den nicht infizierten Vierteln mit dem Durchschnitt der letzten 5 Morgengemelke vor der Infektion. \*p<0,001 Boxplots: Median (—); MW (▪); Interquartilbereich (Box), 5. (⊥), 95. (⊤) Perzentil.

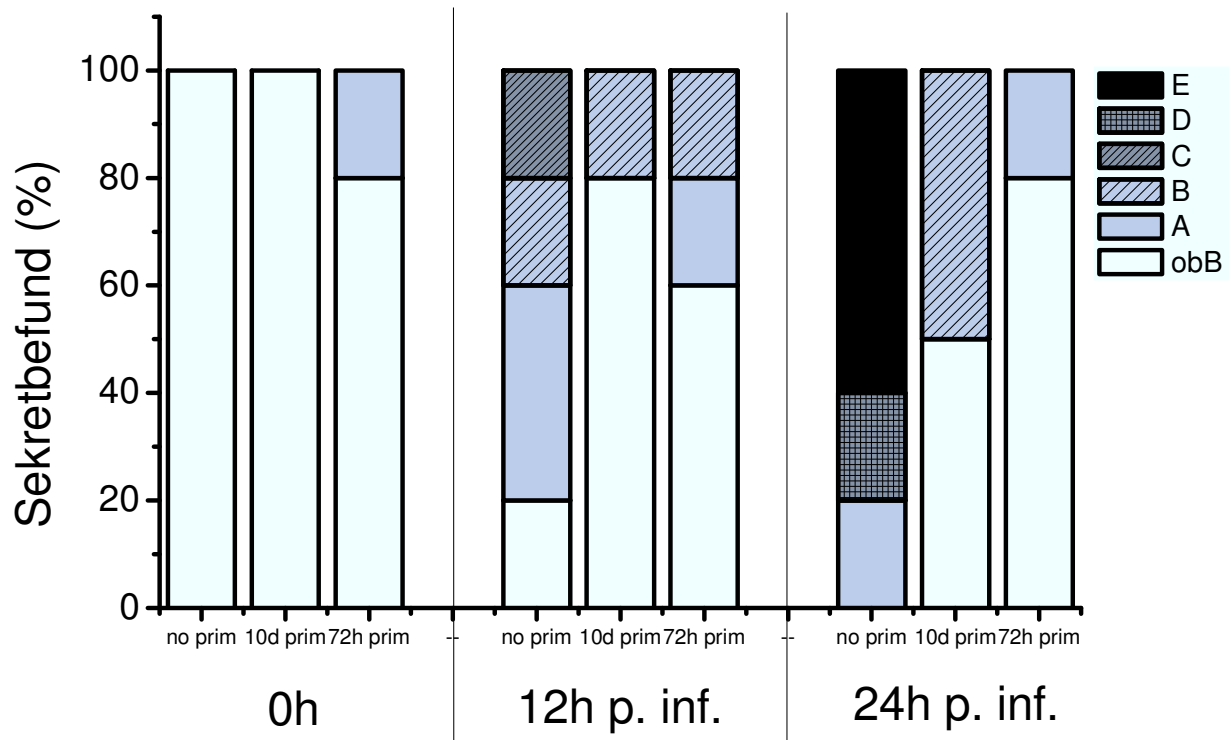
Die Milchleistungen zum Zeitpunkt 12h p. inf. konnten nicht ausgewertet werden, da durch die Behandlung mit Oxytozin zum Versuchsbeginn (siehe 3.3.7) sämtliches Residualgemelk entfernt wurde und damit zum Zeitpunkt 12h eine scheinbare Reduktion der Gemelksmenge festzustellen war. Das Residualgemelk nach Oxytozinbehandlung wurde zwar erfasst, eine seriöse Beurteilung der 12h-Milchleistung ist aber nicht möglich.

Bei der Auswertung der Milchleistung auf den nicht infizierten Vierteln 24h p. inf. zeigte sich folgendes Ergebnis: Die Kontrolltiere ohne Vorbehandlung wie auch die „10d priming“-Tiere wiesen einen Abfall der Milchleistung um 30 (22-60)% auf. Die „72h priming“-Tiere zeigten auf den nicht infizierten Vierteln keinen Abfall der Milchleistung (siehe Abbildung 14).

Bei der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-Rangsummen-Test ergab sich ein signifikanter Unterschied (p<0,001) zwischen Kontrolltieren und „72h priming“-Tieren im Milchabfall 24h p. inf. auf den nicht infizierten Vierteln. Zwischen Kontrolltieren und „10d priming“-Tieren ergab sich kein signifikanter Unterschied bei der Differenz der Milchleistung, aber wieder ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe „72h priming“ und „10d priming“ auf den nicht infizierten Vierteln (p<0,001).

### 4.3.5 Sekretveränderungen bei experimenteller *E. coli*-Mastitis

#### 4.3.5.1 Infizierte Viertel



**Abbildung 15: Veränderungen des Milchsekrets im Verlauf einer experimentellen *E. coli*-Mastitis nach unterschiedlicher Vorbehandlung mit LPS**

Dargestellt sind der prozentuale Anteil von Eutervierteln mit veränderter Sekretbeschaffenheit in *E. coli*-infizierten Vierteln der Kontrolltiere („no priming“; n=5), der 72h nach „LPS-Priming“ infizierten Tiere („72h priming“; n=5) und der Tiere, die 10d nach dem „Priming“ infiziert wurden („10d priming“; n=10). A= Milchcharakter erhalten, wässrig ohne Flocken, B= Milchcharakter erhalten, wässrig mit kleinen Flocken, C= Milchcharakter erhalten, einige grobe Flocken, D= Milchcharakter erhalten, viele grobe Flocken, E= Milchcharakter weitgehend verloren, vorwiegend Flocken.

Zu Beginn des Versuchs zeigten alle Tiere der „no priming“-Gruppe und der „10d priming“-Gruppe unverändertes Milchsekret (100%). In der „72h priming“-Gruppe zeigte ein Tier noch geringgradig verändertes Sekret (siehe Abbildung 15). 12h nach intramammär gesetzter *E. coli*-Infektion zeigte der überwiegende Anteil (80%; 4 von 5 Tieren) der „10d priming“-Gruppe nach wie vor ein unverändertes Sekret auf den infizierten Vierteln während die „ungeprimte“ Gruppe bereits zu 80% (4 von 5 Tieren) Veränderungen aufwies (siehe Abbildung 15). Entscheidender zeigten sich jedoch die Unterschiede 24h nach Infektionsbeginn. Während bei der „no priming“-Gruppe alle Probanden veränderte Sekretbeschaffenheit mit teilweisem Verlust des Milchcharakters aufwiesen, zeigte die „10d priming“-Gruppe nur zu 50% (5 von 10 Tieren) Veränderungen in Form von geringgradiger

Flockenbildung (siehe Abbildung 15). Flocken konnten in der „72h priming“-Gruppe nur einmalig 12h nach Infektionsbeginn bei einem Tier festgestellt werden (20%). Die allenfalls geringgradigen Abweichungen betrafen nie mehr als 40% der Tiere (2 von 5 Tieren; siehe Abbildung 15)

#### 4.3.5.2 Nicht infizierte Viertel

Auf den nicht infizierten Vierteln zeigten die „no priming“-Tiere 12 und 24h p. inf. keine Veränderung des Milchsekrets. Die „10d priming“-Gruppe zeigte 12h nach *E. coli*-Inokulation auf den nicht infizierten Vierteln keine Veränderungen des Milchsekrets, 24h nach Infektion war das Sekret auf einem von 30 Vierteln leicht verändert (geringgradige Flockenbildung). Die 72h vor der Infektion mit LPS vorbehandelten Tiere zeigten auf den infizierten Vierteln vergleichsweise die schwächste Reaktion (vgl. 4.3.5.1) auf den benachbarten nicht infizierten Vierteln jedoch die stärksten Abweichungen: Bereits 12h nach der Infektion waren 40% der Milchsekrete aus benachbarten Vierteln (6 von 15 Vierteln) verändert (20% A-Sekret und 20% B-Sekret; siehe 3.3.10.3-Methoden). Zum Zeitpunkt 24h p. inf. waren nur noch 20% der Sekrete verändert.

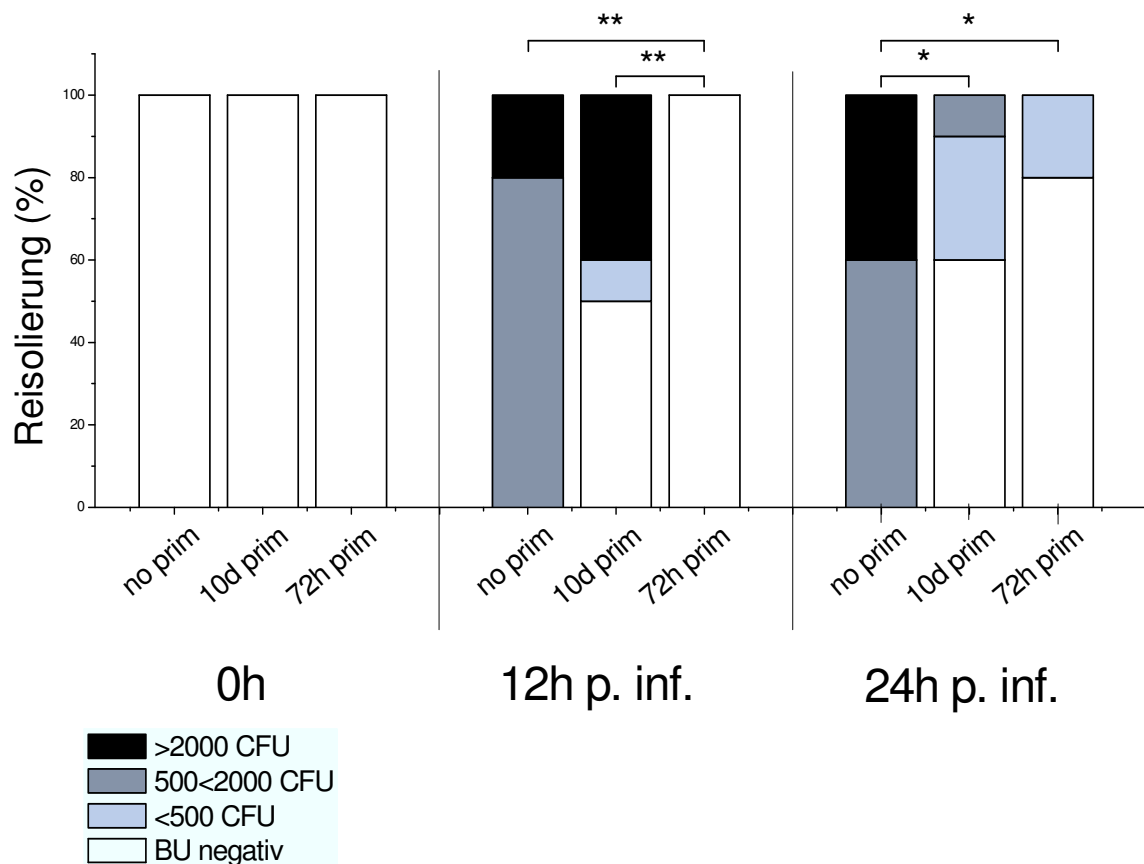
#### 4.3.6 Bakteriologische Befunde in der Milch

Vor jedem Melken wurden während des Versuchs Milchproben für die bakteriologische Untersuchung der einzelnen Euterviertel der Tiere gewonnen (siehe 3.3.8).

Die mit *E. coli* infizierten Viertel ohne „LPS-Priming“ („no priming“) waren ab der ersten Melkzeit nach Versuchsbeginn durchgängig kulturell positiv für *E. coli*. Bereits 12h nach Inokulation von *E. coli* war bei 80% der Tiere ein Gehalt von 500 bis 2000CFU *E. coli* pro ml Milch und bei 20% der Tiere ein Gehalt von über 2000CFU /ml Milch nachweisbar. Nach 24h lag der Anteil der Tiere mit einem Gehalt von über 2000CFU /ml Milch bereits bei 40% (siehe Abbildung 16). In der Gruppe „10d priming“ waren 50% der Probanden 12h p. inf. bakteriologisch negativ. Bei 10% der Tiere wurde ein Gehalt unter 500CFU /ml Milch und bei 40% über 2000CFU /ml Milch nachgewiesen. Bereits 24h p. inf. waren 60% der Tiere bakteriologisch negativ, bei 30% fanden sich unter 500CFU /ml Milch und bei 10% zwischen 500 und 2000CFU pro ml Milch (siehe Abbildung 16).

Unter den Tieren der Gruppe „72h priming“ konnte 12h nach der Infektion kein Erreger nachgewiesen werden; weitere 12h später wurde nur in einer Milchprobe (entspricht 20%) *E. coli* gefunden (<500CFU /ml Milch). Bei 4 Tieren war die bakteriologische Untersuchung negativ (siehe Abbildung 16).

Zum Zeitpunkt 12h p. inf. waren alle 5 Kontrolltiere („no priming“) in der bakteriologischen Untersuchung positiv, während keines der „72h priming“ Tiere (n=5) positiv war. Die Hälfte der über 10d geprimten Tiere (n=10) waren positiv. Es zeigte sich jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen der „72h priming“-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe („no priming“) und der „10d priming“-Gruppe ( $p < 0,01$ ). Zum Zeitpunkt 24h p. inf. bestand jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und den beiden „geprimten“ Gruppen ( $p < 0,05$ ). Unterschiede zwischen den Gruppen „72h priming“ und „10d priming“ waren hier statistisch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).



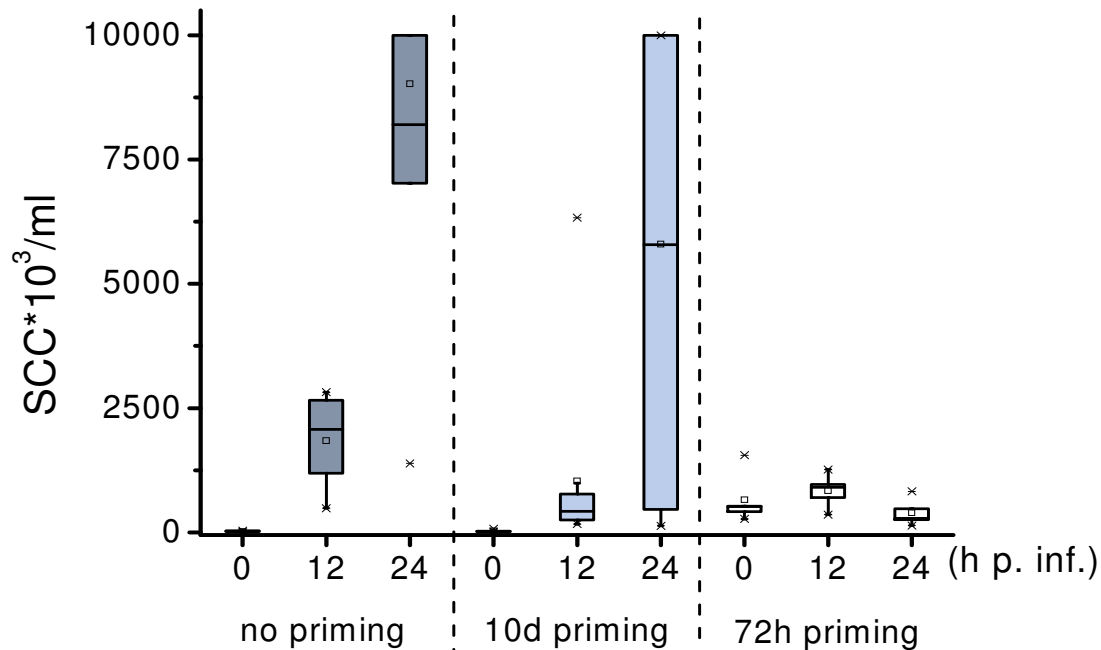
**Abbildung 16: Kulturelle Reisolierung von *E. coli* aus dem Milchsekret experimentell infizierter Tiere**

Dargestellt sind die bakteriologischen Befunde der infizierten Viertel der 3 Versuchsgruppen 0, 12 und 24h nach der Infektion in %. Zur Stunde 0 wurden den Tieren 500 CFU *E. coli* in jeweils ein Euterviertel inokuliert. Die Anzahl der Tiere beträgt für die Gruppe ohne Vorbehandlung („no priming“), und die Gruppe, die über 72h vor Infektion mit LPS vorbehandelt wurde („72h priming“) jeweils n=5 und bei der 10d vor Infektion vorbehandelten Gruppe n=10 („10d priming“). \*\*p<0,005, \*p<0,05.

#### 4.3.7 Somatischer Zellgehalt der Milch (SCC) im Infektionsverlauf

Die Zellgehalte in den Gemelken der einzelnen Viertel wurden getrennt nach infizierten Vierteln und nicht infizierten Vierteln ausgewertet. Bei „ungeprimten“ Tieren („no priming“) konnte invariant eine starke Zunahme der Milchzellzahl im infizierten Viertel festgestellt werden. Der Ausgangszellgehalt von  $\bar{x}$  2,8 (2,5-3,4)  $\cdot 10^4$  Zellen/ml Milch entwickelte sich über  $\bar{x}$  2,07 (1,19-2,26)  $\cdot 10^6$  Zellen/ml Milch (12h) bis hin zu Maximalwerten von  $\bar{x}$  8,2 (7,02-9,99)  $\cdot 10^6$  Zellen/ml Milch 24h nach Infektionsbeginn. Tiere, die 10d vor experimenteller *E. coli*-Infektion intramammär mit LPS vorbehandelt worden waren („10d priming“), zeigten ebenfalls niedrige Ausgangswerte (SCC=  $\bar{x}$  2,4 [2,1-2,8]  $\cdot 10^4$ /ml Milch). Hier zeigten sich jedoch niedrigere Werte 12h nach Infektion (SCC=  $\bar{x}$  4,37 [2,68-6,94]  $\cdot 10^5$ /ml Milch) verglichen mit der Kontrollgruppe (p<0,001) und deutlich stärkere interindividuelle

Unterschiede nach 24h (siehe Abbildung 17). Die Gruppe „72h priming“ zeigte zum Zeitpunkt der Infektion noch einen relativ hohen Ausgangszellgehalt von  $\bar{x}$  5,23 (4,20-5,31)\* $10^5$  Zellen/ml, welcher nur schwach nach 12h anstieg (SCC= $\bar{x}$  9,09 [7,06-9,66]\* $10^5$ /ml Milch) und nach 24h bereits wieder unter dem Ausgangsniveau lag (siehe Abbildung 17). Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.



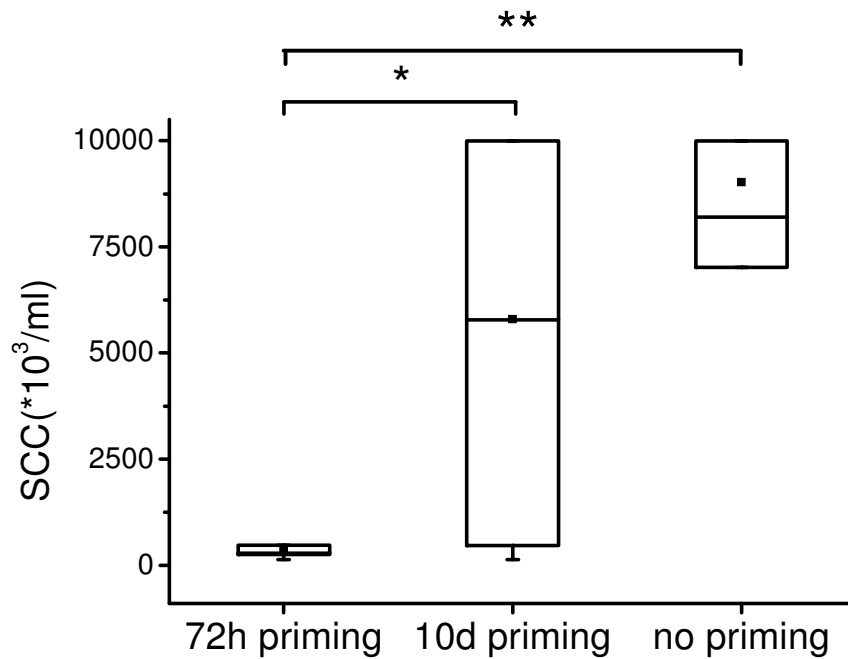
**Abbildung 17: Entwicklung der Somatischen Zellzahl (SCC) nach experimenteller *E. coli*-Infektion (infizierte Viertel)**

Dargestellt ist die Entwicklung des SCC in mit *E. coli* infizierten Vierteln der Kontrolltiere („no priming“; n=5), der 72h nach „LPS-Priming“ infizierten Tiere („72h priming“; n=5) und der Tiere, die 10d nach dem „Priming“ infiziert wurden („10d priming“; n=10). Boxplots: Median (—); MW (▪); Interquartilbereich (Box), 5. (⊥), 95. (⊤) Perzentil.

Statistischer Vergleich innerhalb der Gruppen: Die Mediane unterscheiden sich zwischen den 3 Meßzeiten immer signifikant ( $p < 0,001$ ).

Statistischer Vergleich zwischen den Gruppen: Die Mediane zu den einzelnen Zeitpunkten unterscheiden sich jeweils signifikant ( $p < 0,001$ ), außer zwischen der „no priming“-Gruppe und der „10d priming“-Gruppe zu den Zeitpunkten 0 und 24h.

Im Gruppenvergleich war die Milchzellzahl 24h p. inf. in den Gruppen „no priming“ und „10d priming“ jeweils signifikant höher als in der Gruppe „72h priming“ ( $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 18).



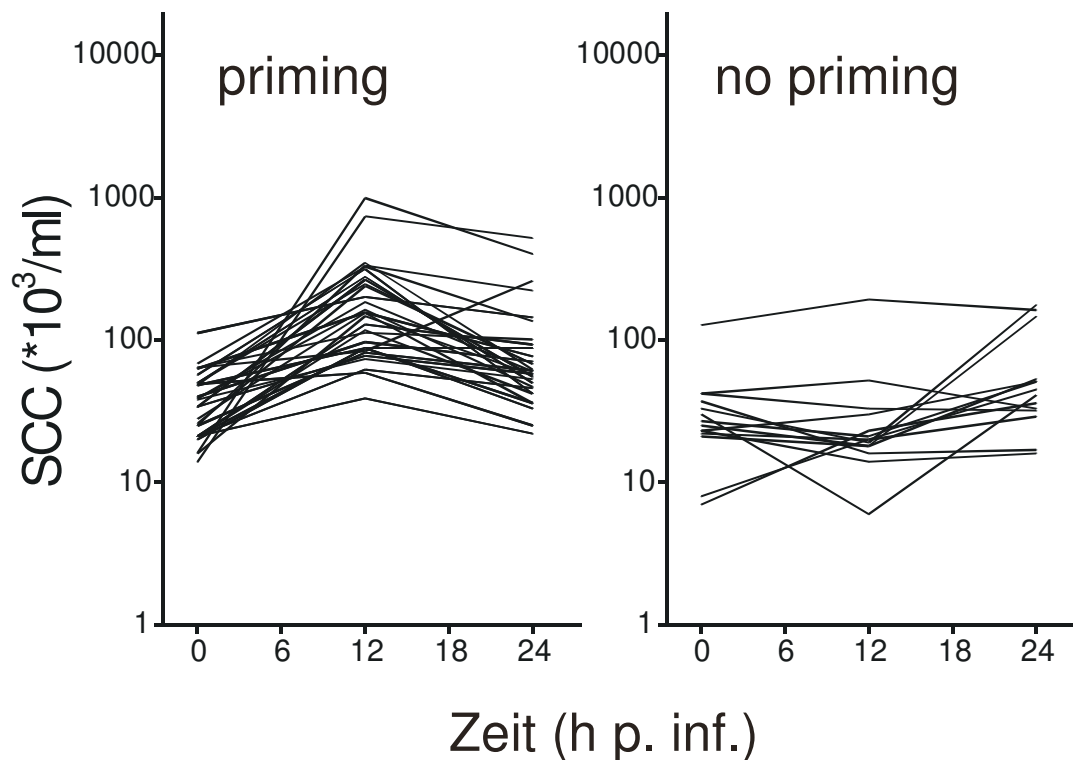
**Abbildung 18: Vergleichende Darstellung des SCC auf den infizierten Vierteln 24h nach Infektion mit *E. coli***

Dargestellt ist der Vergleich der Zellgehalte 24h nach der Infektion in den infizierten Vierteln als Boxplots. Die Anzahl der ausgewerteten Milchproben beträgt für die Gruppe der Kontrolltiere („no priming“) und die 72h Tiere („72h priming“)  $n=5$  und die 10d Gruppe („10d priming“)  $n=10$ . \*\*=statistisch signifikante Unterschiede ( $p<0,01$ ), \*: $p<0,05$

Boxplots: Median (—); MW (•); Interquartilbereich (Box), 5. (⊥), 95. (⌈) Perzentil.

Die Entwicklung der Zellgehalte in den nicht infizierten Vierteln ist in Abbildung 19 dargestellt. Zum Zeitpunkt der Infektion lag der SCC bei den „no priming“-Tieren ohne Vorbehandlung bei  $\tilde{x}$  2,7 (2,3-3,5) $\cdot 10^4$  Zellen/ml Milch, in der „10d priming“-Gruppe bei  $\tilde{x}$  3,6 (2,1-5,0) $\cdot 10^4$  Zellen/ml Milch und in der „72h priming“-Gruppe noch bei  $\tilde{x}$  5,09 (4,42-11,72) $\cdot 10^5$  Zellen/ml Milch. Bedingt durch den kürzeren zeitlichen Abstand zu der LPS-Inokulation war der Zellgehalt bei der „72h priming“-Gruppe zum Zeitpunkt der Infektion noch signifikant höher ( $p<0,001$ ). 12h p. inf. ergibt der statistische Vergleich der Zellgehalte signifikante Unterschiede zwischen der „72h priming“-Gruppe und der „no priming“-Gruppe ( $p<0,001$ ), zwischen der „72h priming“-Gruppe und der „10d priming“-Gruppe ( $p<0,001$ ) sowie zwischen der „10d priming“-Gruppe und der „no priming“-Gruppe ( $p<0,001$ ). Der Median der SCC liegt bei der „no priming“-Gruppe bei  $\tilde{x}$  2,0 (1,8-3,2) $\cdot 10^4$  Zellen/ml Milch, bei der „10d priming“-Gruppe bei  $\tilde{x}$  1,52 (0,88-2,61) $\cdot 10^5$  Zellen/ml Milch und bei der „72h priming“-Gruppe bei  $\tilde{x}$  9,03 (5,41-10,29) $\cdot 10^5$  Zellen/ml Milch, beide letztere Gruppen zeigen damit auf den nicht infizierten Vierteln im Gegensatz zur „no priming“-Gruppe einen Anstieg des Zellgehalts. 24h nach der Infektion zeigt der Vergleich des SCC zwischen den drei Gruppen noch signifikante Unterschiede zwischen der „no priming“-Gruppe und der „72h priming“-Gruppe ( $p<0,001$ ) sowie zwischen der „72h priming“-Gruppe und der „10d priming“-Gruppe ( $p<0,001$ ).





**Abbildung 19: Vergleich der Entwicklung des SCC auf den nicht infizierten Vierteln nach der *E. coli*-Infektion zwischen geprimten und nicht geprimten Tieren**

Dargestellt ist vergleichend der Verlauf der Zellgehalte in den nicht infizierten Vierteln während den ersten 24h p. inf. Die Anzahl der Milchproben beträgt für die „Priminggruppe“ n=45 und für die Kontrollgruppe ohne Vorbehandlung n=15.

In Abbildung 19 ist damit zu erkennen, dass nicht infizierte Nachbarviertel „geprimter“ Tiere nach der Infektion des Versuchsviertels mit einem Anstieg des Zellgehalts reagieren. Im Gegensatz dazu reagieren nicht infizierte Nachbarviertel nicht „geprimter“ Tiere bei einer Infektion mit *E. coli* nicht mit einem Anstieg des Zellgehalts. Bei der durchflußzytometrischen Analyse der Milchzellzahl und -zusammensetzung wurden diese Ergebnisse bestätigt (siehe 4.3.8.1).

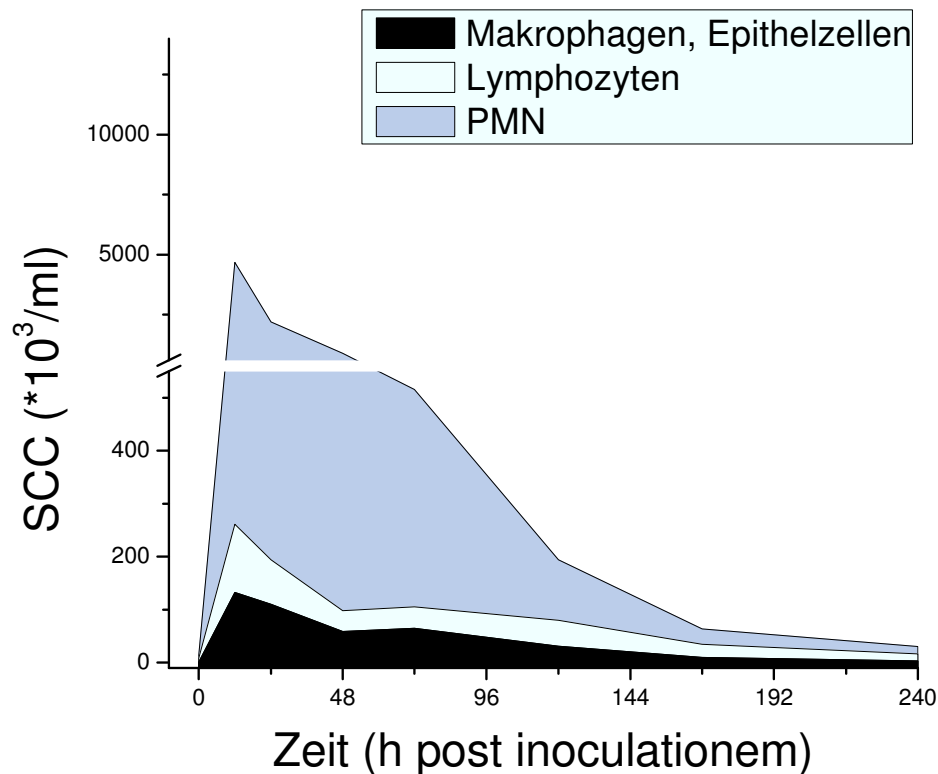
### 4.3.8 Durchflusszytometrische Milchzellendifferenzierung

Die Auswirkung einer intramammären Infektion mit *E. coli* auf das Differentialzellbild der Milch wurde durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei sollten unterschiedliche Effekte eines vorhergegangenen „LPS-Priming“ auf ausgewählte ins Lumen der Milchdrüse immigrierende Leukozytensubpopulationen überprüft werden.

#### 4.3.8.1 Zelldifferenzierung mittels Acridin-Orange/Propidiumjodid-Färbung

Zur morphologischen Differenzierung der Zellen, die in der Milch nachweisbar sind, wurden die Milchzellen wie unter 3.3.13 beschrieben aufgereinigt, mit Acridin-Orange und Propidiumjodid angefärbt und dann im Durchflusszytometer differenziert. Anhand des bekannten Gesamtzellgehalts (SCC, siehe 4.3.7) wurden dann die Absolutzahlen verschiedener Zellpopulationen berechnet. Abbildung 20 zeigt Veränderungen in der Anzahl der einzelnen morphologisch differenzierbaren Milchzellfraktionen nach der intramammären Inokulation von LPS. Während des unter 4.3.7 beschriebenen SCC-Anstiegs zeigte sich, dass PMN als dominierende Zellpopulation für diesen Anstieg verantwortlich war. Zum Zeitpunkt 0h waren  $\bar{x} 4 (1,9-11,1) \cdot 10^3$  PMN pro ml Milch zu finden (siehe Abbildung 20). 12h nach LPS-Inokulation stieg die Anzahl der PMN auf  $\bar{x} 4,4 (2,9-7,1) \cdot 10^6$  PMN /ml Milch an, nach 24h war der Parameter wieder auf  $\bar{x} 2,0 (1,3-3,1) \cdot 10^6$  PMN /ml Milch gesunken. Danach erfolgte ein kontinuierlicher Rückgang bis auf  $\bar{x} 1,4 (0,7-2,1) \cdot 10^4$  PMN pro ml Milch nach 240h. Es waren also nach 240h die Ausgangswerte annähernd wieder erreicht (siehe Abbildung 20).

Der relative Anteil an lymphoiden Zellen und Makrophagen sank hingegen trotz ebenfalls ansteigender absoluter Zahlen bei diesen Populationen. Zur Stunde 0 waren in der Milch  $\bar{x} 6,9 (4,3-9,9) \cdot 10^3$  Lymphozyten pro ml Milch zu finden. 12h nach Inokulation von LPS in die Euterviertel stieg dieser Wert auf  $\bar{x} 1,29 (0,78-2,64) \cdot 10^5$  Lymphozyten pro ml Milch an. Danach sank dieser Wert wieder ab und erreichte 240h nach der LPS-Inokulation mit  $\bar{x} 1,3 (1,1-1,8) \cdot 10^4$  Lymphozyten pro ml Milch annähernd wieder das Niveau bei Versuchsbeginn. Als Ausgangswert der Makrophagen bzw. Epithelzellen wurden im Hauptgemelk pro ml Milch  $\bar{x} 0,99 (0,6-3,0) \cdot 10^3$  Zellen gefunden. 12h nach Inokulation von LPS stieg diese Anzahl auf  $\bar{x} 1,32 (0,74-1,94) \cdot 10^5$  Zellen/ml Milch an (siehe Abbildung 20). Ab 24h nach „LPS-Priming“ erfolgte ein konstanter Rückgang der Makrophagen und epitheloiden Zellen, bis nach 240h nur noch  $\bar{x} 3,35 (1,75-5,44) \cdot 10^3$  Zellen pro ml Milch zu finden waren.

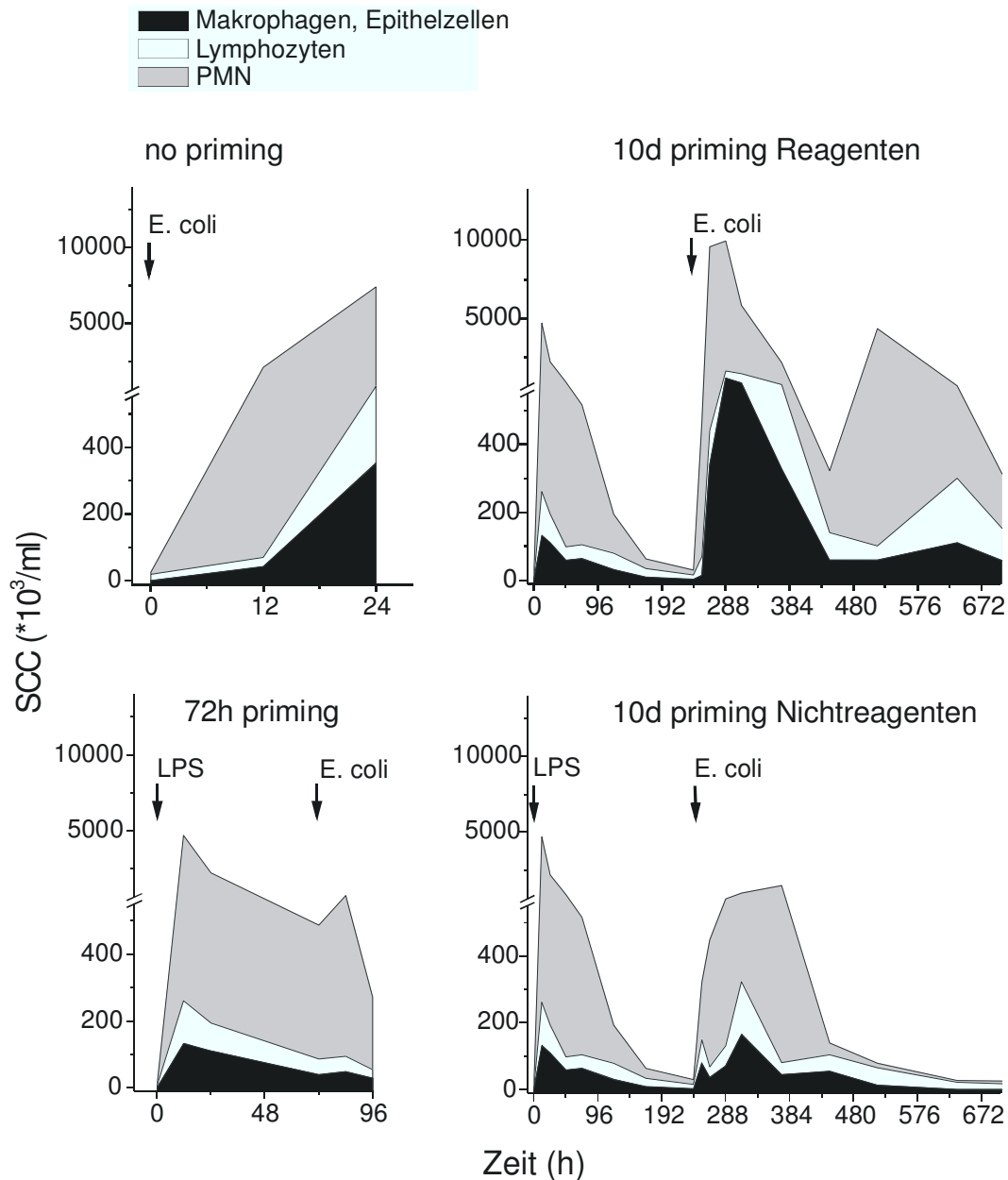


**Abbildung 20: Veränderung der Milchzellzusammensetzung nach Inokulation von LPS**

Dargestellt ist die Zusammensetzung der Milchzellen nach der Inokulation von LPS in die Euterviertel von Kühen. Die Zellen wurden nach Anfärbung durchflusszytometrisch nach Makrophagen/Epithelzellen, Lymphozyten und PMN differenziert. Die Anzahl der differenzierten Milchproben beträgt bis zur Stunde 72 n=60 und weiter bis zur Stunde 240 n=20.

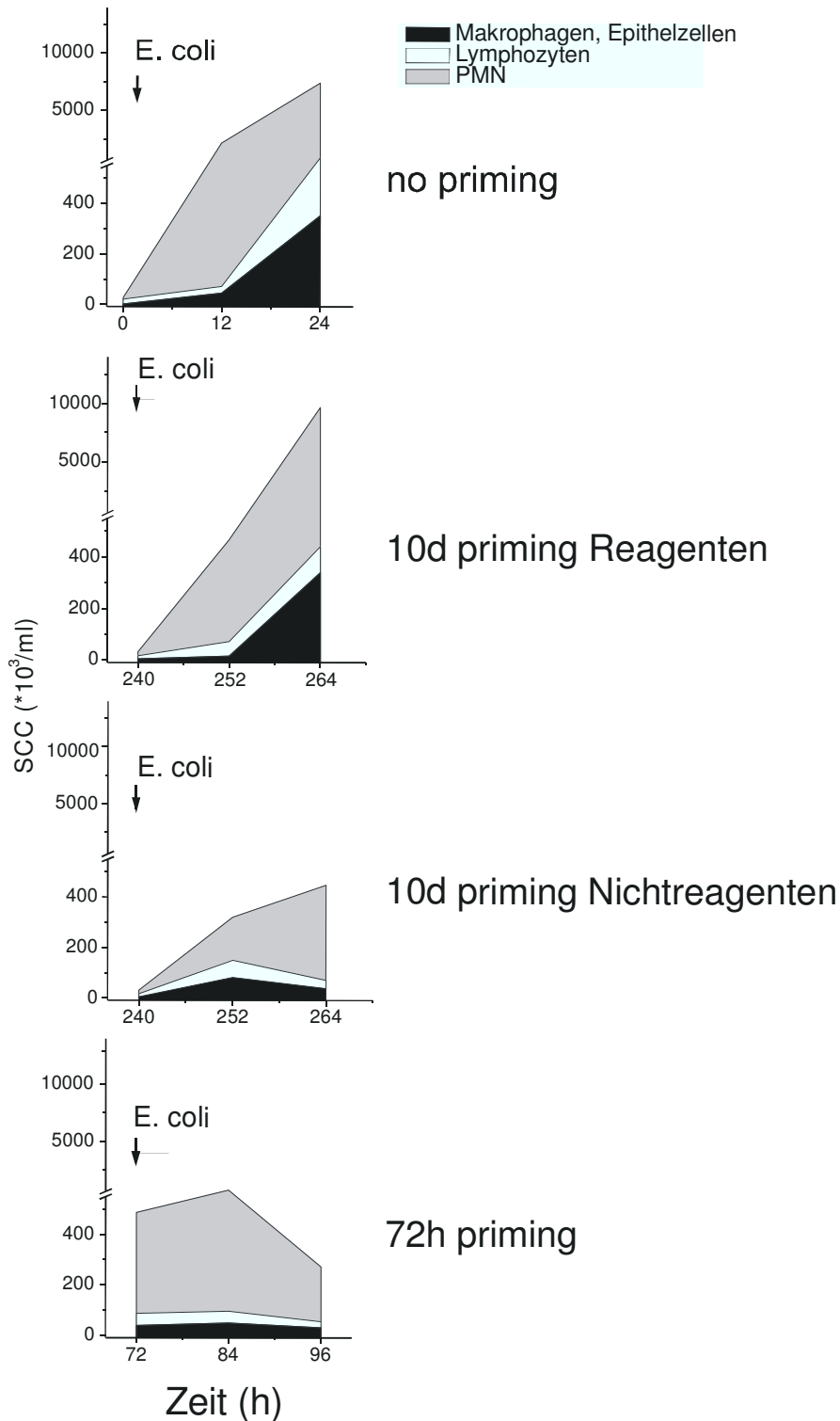
Abbildung 21 zeigt in einer vergleichenden Darstellung die Entwicklung der Zellfraktionen in der Milch während der „Priming“-/Infektionsversuche. Dabei wurden die einzelnen Gruppen dargestellt: „no priming“, „72h priming“ und „10d priming“. Allerdings zeigten die 10 Tiere der „10d priming“-Gruppe zwei grundsätzliche Reaktionsmuster. 5 Tiere entwickelten innerhalb von 24h nach der Infektion eine klinische Mastitis und 5 Tiere zeigten nur einen Anstieg des SCC ohne Anzeichen einer klinischen Mastitis. Da dadurch der SCC zwischen den beiden Gruppen sehr stark unterschiedliche Werte zeigt, wurde diese unterteilt in „Reagenten“ (Tiere die eine klinische Mastitis entwickelt haben) und „Nichtreagenten“ (Tiere die keine klinische Mastitis entwickelt haben). So getrennt wurden die Parameter dann ausgewertet und im Folgenden dargestellt.

Insgesamt zeigen die Werte, dass die Veränderungen in der Zusammensetzung der Milchzellen einheitlich über alle Gruppen stark von Veränderungen des SCC abhängt (siehe auch 4.3.7). Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung der Milchzellen zwischen den einzelnen Gruppen und zwischen den einzelnen Zeitpunkten zeigen. Bemerkenswert ist der hohe Anteil an Makrophagen/Epithelzellen bei der „no priming“-Gruppe und der Reagentengruppe „10d priming“, also bei Tieren, bei denen *E. coli* nachgewiesen wurde (siehe auch 4.3.6).



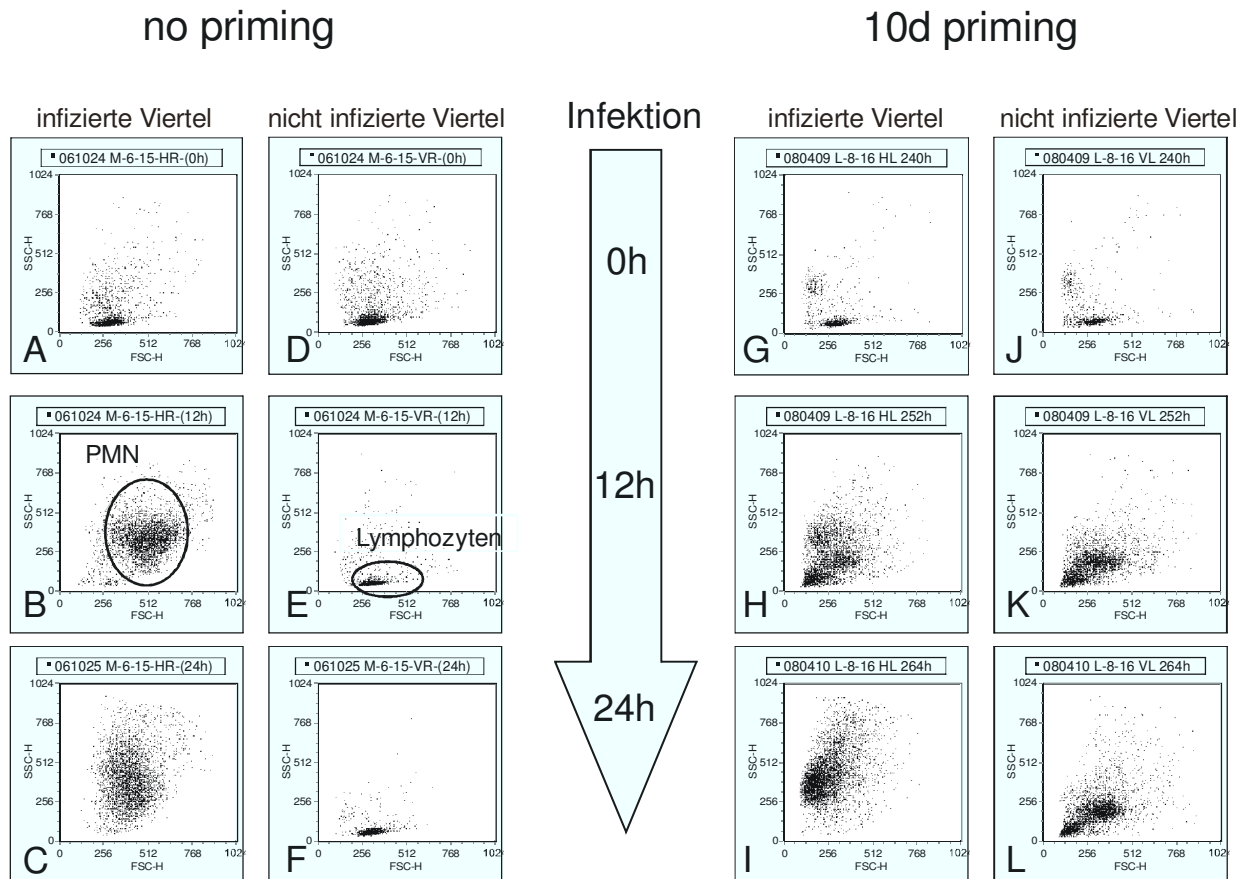
**Abbildung 21: Zusammensetzung des Milchzellgehalts im Verlauf der „Priming“- und Infektionsversuche**

Dargestellt ist die Milchzellzusammensetzung in den 4 Gruppen „no priming“, „72h priming“, „10d priming Reagenten“ und „10d priming Nichtreagenten“ über den gesamten Zeitraum des Versuchs. Die Zellen wurden nach Anfärbung durchflusszytometrisch nach Makrophagen/Epithelzellen, Lymphozyten und PMN differenziert. Die Anzahl der differenzierten Milchproben beträgt für jede Gruppe jeweils n=5.



**Abbildung 22: Vergleichende Darstellung der einzelnen Zellfraktionen in den Gruppen nach der *E. coli*-Infektion**

Dargestellt ist die Entwicklung der einzelnen Zellfraktionen im Infektionsverlauf vergleichend auf den infizierten Vierteln. Zu Beginn des dargestellten Zeitraums wurden den Tieren jeweils 500CFU *E. coli* in ein Euterviertel inokuliert. Die „10d priming“-Gruppe wurde weiter unterteilt in „Reagenten“ (Tiere die eine klinische Mastitis entwickelt haben) und „Nichtreagenten“ (Tiere, die keine klinische Mastitis entwickelt haben). Die Anzahl der Proben beträgt für jede Gruppe n=5.



**Abbildung 23: Entwicklung der Milchzellpopulationen in den nicht infizierten Vierteln nach der Infektion**

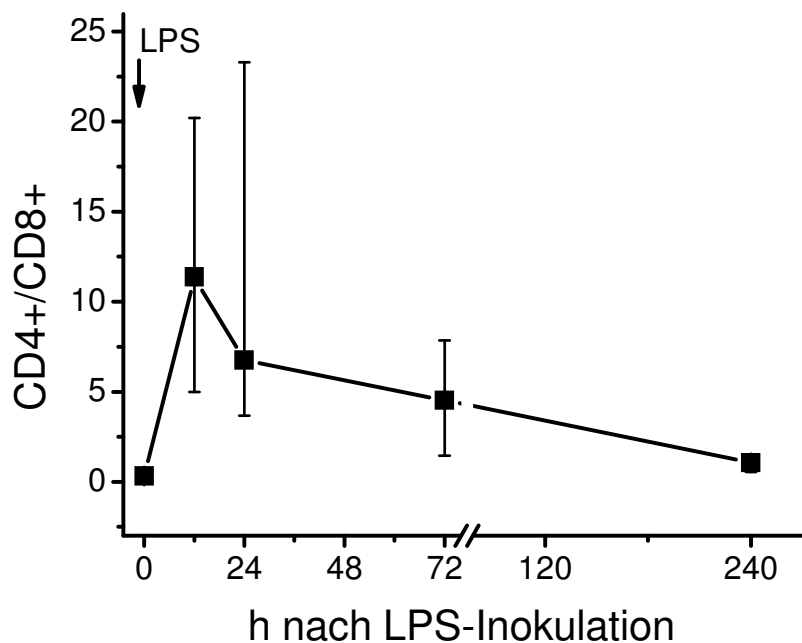
In der Abbildung sind Punktediagramme aus der Durchflusszytometrie nach Acridin-Orange-Färbung (siehe 3.3.15) vergleichend dargestellt. Erfasst wurden jeweils 10.000 Ereignisse. A= naives Viertel vor der Infektion, B= infiziertes, nicht „geprimtes“ Viertel 12h nach Infektion, C= infiziertes, nicht „geprimtes“ Viertel 24h nach Infektion, D=naives Nachbarviertel vor Infektion, E= nicht „geprimtes“ Nachbarviertel 12h nach Infektion, F= nicht „geprimtes“ Nachbarviertel 24h nach Infektion, G= „geprimtes“ Viertel vor Infektion, H= infiziertes, „geprimtes“ Viertel 12h nach Infektion, I= infiziertes, „geprimtes“ Viertel 24h nach Infektion, J= „geprimtes“ Nachbarviertel vor Infektion, K= „geprimtes“ Nachbarviertel 12h nach Infektion, L= „geprimtes“ Nachbarviertel 24h nach Infektion

Abbildung 23 zeigt den Vergleich der Entwicklung der Zellpopulationen zwischen „no priming“-Gruppe und „10d priming“-Gruppe. Hierbei zeigen die einwandernden Zellen eine veränderte Morphologie. Zum Zeitpunkt 0h finden sich im Milchsekret überwiegend Lymphozyten (siehe Abbildung 23 A, D, G, J). In der Gruppe „no priming“ kommt es 12h p. inf. nur im infizierten Viertel zu einem Ansteigen des Gehalts an PMN. Dagegen steigt der Gehalt an PMN bei der „10d priming“-Gruppe 12h p. inf. in den infizierten Vierteln und den nicht infizierten Nachbarvierteln an. Dieses Phänomen ist auch 24h p. inf. bei den Gruppen so zu beobachten. Daraus lässt sich folgern, dass der Anstieg des SCC auf einen Anstieg der PMN zurückzuführen ist.

#### 4.3.8.2 Milchzellendifferenzierung mittels Membranimmunfluoreszenz

##### Verhältnis CD4+/CD8+-Lymphozyten

Mittels der Membranimmunfluoreszenz und der Durchflusszytometrie (siehe 3.3.16) wurden unter den lymphoiden Milchzellen die CD4+- und CD8+-Zellen identifiziert und quantifiziert. Diese Untersuchungen wurden nur bei der „10d priming“-Gruppe durchgeführt. Bei den Milchzellen des naiven Euters wurde dabei ein Verhältnis CD4+/CD8+ von  $\tilde{x}$  0,31(0,25-0,34) gefunden. 12h nach LPS-Inokulation stieg die Gesamtzahl lymphoider Zellen in der Milch an, wobei hier eine relativ stärkere Zunahme der CD4+-Lymphozyten festzustellen war, so dass das Verhältnis auf  $\tilde{x}$  11 (5-20) anstieg (siehe Abbildung 24). Im weiteren Verlauf normalisierte sich das Verhältnis wieder und hatte 240h nach Priming mit  $\tilde{x}$  1,05 (0,5-1,4) bereits wieder fast das Ausgangsniveau erreicht (siehe Abbildung 24).

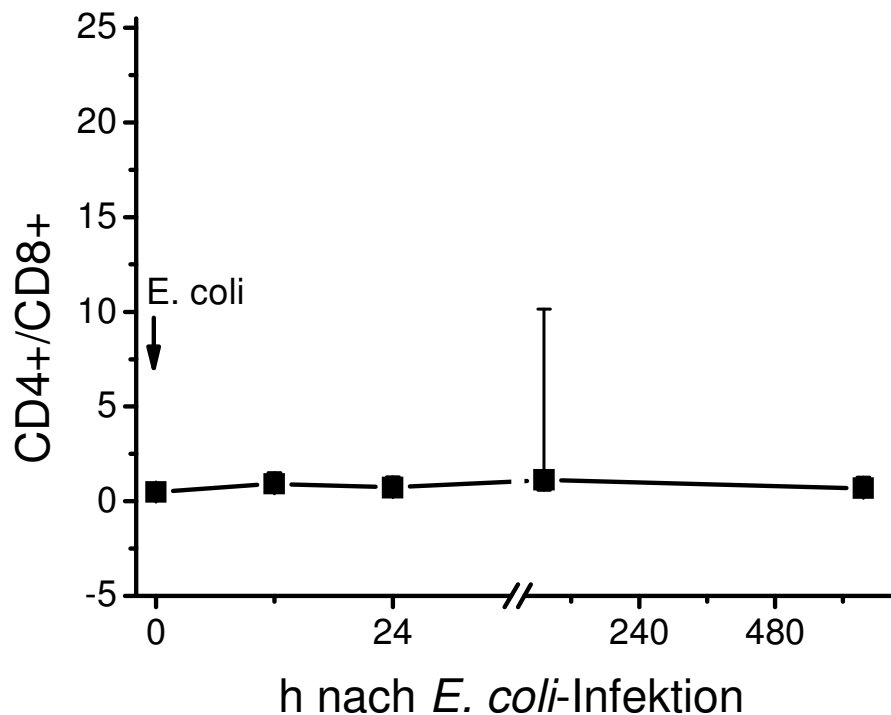


**Abbildung 24: Verhältnis von CD4+/CD8+-Lymphozyten in der Milch nach LPS-Inokulation bei „10d priming“-Tieren**

Dargestellt ist das Verhältnis ( $\tilde{x} \pm 1.$  und 3. Quartil) der CD4+- zu CD8+-Lymphozyten in der Milch nach intramammärer Gabe von  $1\mu\text{g}$  LPS zu den einzelnen Messzeitpunkten. Die Analyse erfolgte mittels Membranimmunfluoreszenz und Durchflusszytometrie (siehe 3.3.16) in der „10d priming“-Gruppe. Das CD4+/CD8+-Verhältnis unterscheidet sich zu jedem Zeitpunkt voneinander außer 12h zu 24h und 24h zu 72h sowie 240h. (n=10)

Abbildung 25 zeigt den Verlauf des CD4+/CD8+-Verhältnisses nach der Infektion bei den Tieren der „10d priming“-Gruppe. Je nach Stärke des Zellzahlanstiegs verschiebt sich das Verhältnis stärker zugunsten der CD4+-Zellen. Ist der Zelleinstrom größer, wandern also überproportional mehr CD4+-Zellen in die Milch ein. Hier konnte kein Unterschied zwischen dem Zellanstieg aufgrund einer intramammären LPS-Behandlung (siehe Abbildung 25) oder

einem *E. coli*-bedingten Zellzahlanstieg festgestellt werden.



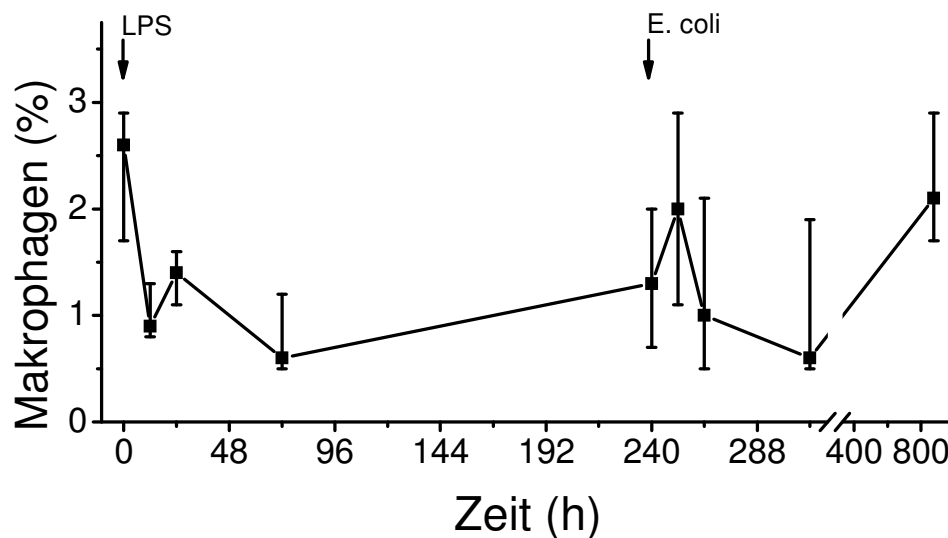
**Abbildung 25: Verhältnis CD4+/CD8+-Lymphozyten in der Milch nach der *E. coli*-Infektion in den infizierten Vierteln bei „10d-priming“-Tieren**

Dargestellt ist das Verhältnis der CD4+-Milchzellen zu den CD8+-Milchzellen ( $\bar{x} \pm 1.$  und 3. Quartil) nach der Infektion mit *E. coli* in der „10d priming“-Gruppe. Die Anzahl der Milchproben beträgt zu jedem Messzeitpunkt  $n=10$  bis zur Stunde 24 und  $n=5$  im weiteren Verlauf. Die Analyse erfolgte mittels Membranimmunfluoreszenz und Durchflusszytometrie (siehe 3.3.16).

### Makrophagen in der Milch

Abbildung 26 zeigt den prozentualen Anteil der Makrophagen an den somatischen Zellen in der Milch der Tiere der „10d priming“-Gruppe in den infizierten Vierteln. Wie sich auch schon in der Zelldifferenzierung mit Acridin-Orange-Färbung andeutet (siehe 4.3.8.1), nimmt der prozentuale Anteil der Makrophagen unter dem Einstrom somatischer Zellen in die Milch grundsätzlich ab. Nur kurz nach der Infektion mit *E. coli*, also wenn Bakterien in der Milch erscheinen, nimmt der prozentuale Gehalt an Makrophagen kurzzeitig zu (nicht signifikant).





**Abbildung 26: Anteil der Makrophagen an den somatischen Zellen in der Milch nach LPS- und späterer *E. coli*-Inokulation**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil ( $\tilde{x} \pm 1.$  und 3. Quartil) der Makrophagen an den somatischen Zellen in der Milch auf den infizierten Vierteln der Gruppe der „10d priming“-Tiere (Infektion 10d nach LPS-Inokulation). Die Anzahl der Milchproben beträgt im Zeitraum 0h-264h n=10 und im Zeitraum 265h-876h n=5. Die Analyse erfolgte per Membranimmunfluoreszenz und Durchflusszytometrie (siehe 3.3.16).

#### 4.4 Langzeiteffekte einer *E. coli*-Infektion nach 10-tägigem „LPS-Priming“

5 Tiere der „10d priming“-Gruppe wurden ab Infektionsbeginn über die folgenden 4 Wochen beobachtet. Dadurch war es möglich, individuelle Reaktionen über einen längeren Zeitraum zu verfolgen, insbesondere vor dem Hintergrund der z.T. recht heterogenen Reaktionen auf die *E. coli*-Infektion (vgl. 4.3.8.1). Die unterschiedliche Reaktionsweise setzte sich über den verlängerten Beobachtungszeitraum fort, was sich sowohl durch wieder auftretendes Fieber, bakteriologisch positive Sekretbefunde als auch makroskopisch verändertes Milchsekret zu unterschiedlichen Zeitpunkten darstellte. Keines der Tiere zeigte jedoch eine Störung des Allgemeinbefindens in diesem Beobachtungszeitraum. Tabelle 9 zeigt die klinischen Befunde bei den 5 Versuchskühen während des Beobachtungszeitraums.

Tabelle 9: Klinische Befunde bei Langzeitbeobachtung nach „10d Priming“ und *E. coli*-Infektion

|  | 0h | 12h        | 24h            | 48h        | 72h            | 132h           | 204h | 276h | 396h | 516h | 626h |
|--|----|------------|----------------|------------|----------------|----------------|------|------|------|------|------|
| <b>Fieber</b>                                  |    |            | 19*            | 19*        | 19*            | 19*, 21*       | 20*  | 18** |      |      |      |
| <b><i>E. coli</i>-Nachweis (Milch)</b>         |    | 17, 18, 21 | 17, 18, 21     | 17, 18     | 18             | 19             |      | 18   |      |      |      |
| <b>Sekretveränderung (klinisch)</b>            |    |            | 18, 21         | 17, 18, 21 | 17, 18         | 17, 18, 19, 21 |      | 18   |      |      |      |
| <b>Zellzahl &gt; 1*10<sup>6</sup>/ml Milch</b> |    | 19, 20     | 17, 18, 19, 21 | 17, 18, 21 | 17, 18, 19, 21 | 17, 18         |      | 18   |      |      |      |

\* 39,5-41,0°C; \*\* > 41,0°C

Eine klinische Mastitis mit verändertem Sekret zeigte Tier 17 zwischen Stunde 48 und Stunde 132 nach der Infektion.

Bei Tier 18 waren *E. coli* zwischen Stunde 12 und Stunde 72 nach Infektion nachweisbar und wieder zur Stunde 276, eine klinische Mastitis mit verändertem Sekret war zwischen Stunde 24 und 132 und zur Stunde 276 nach Infektion festzustellen.

Bei Tier 19 waren zur Stunde 72 *E. coli* im Milchsekret zu finden, eine klinische Mastitis zeigte sich zwischen Stunde 78 und Stunde 132 nach Infektion.

Tier 20 reagierte auf die Infektion mit *E. coli* auf dem betroffenen Viertel zwar mit einer Zellzahlerhöhung von  $2,7 \cdot 10^4$ /ml Milch auf  $2 \cdot 10^6$ /ml Milch innerhalb von 12h, Bakterien waren aber im Milchsekret nie nachweisbar, und es entwickelte keine klinische Mastitis.

Bei Tier 21 waren im Milchsekret *E. coli* zwischen Stunde 12 und Stunde 36 nach Infektion nachweisbar, eine klinische Mastitis zeigte das Tier zwischen Stunde 24 und Stunde 72 nach der Infektion.

Aufgrund der geringen n-Zahl wurden zu dieser Fragestellung nur erste orientierende Daten erhoben. Insgesamt zeigen die Tiere sehr heterogene klinische Verläufe, die unabhängig von der Reaktion auf LPS zu sein scheint.

## 5 Diskussion

Die Mastitis des Rindes gehört zu den verlustreichsten Erkrankungen in der Milchproduktion. Speziell die durch *E. coli* ausgelöste Mastitis bedingt gerade in größeren Betrieben hohe Einbußen durch Minderung der Milchmenge und vorzeitiges Ausscheiden von Rindern aus der Produktion. Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob der Mechanismus einer Endotoxintoleranz im bovinen Euter ein reproduzierbares, immunmodulatorisches Geschehen ist und ob durch intramammäre Gabe von Endotoxin (LPS) der Verlauf einer experimentell induzierten *E. coli*-Mastitis zugunsten des Wirtes beeinflussbar ist.

### 5.1 Konzeptionelle Überlegungen

Der Mechanismus der Endotoxintoleranz (auch als „Priming“ bezeichnet) ist in seinen Grundzügen bereits seit den 40er Jahren des vorigen Jahrhunderts bekannt<sup>172</sup>. Wiederholt wurde beobachtet, dass Lebewesen nach vorausgegangenen Infektionen auf einen erneuten Kontakt mit einem Pathogen<sup>176</sup> oder Bestandteilen von diesem (PAMPs)<sup>167,171</sup> mit einer herabgesetzten Immunantwort reagierten im Vergleich mit immunologisch naiven Individuen. Auf molekularer Ebene wurde diese Beobachtung anhand von Zellkultur-Experimenten reproduziert<sup>5</sup>.

Bei Entzündungsreaktionen im Euter geht man davon aus, dass irreparable Gewebeschäden und die teilweise massiven systemischen Auswirkungen weniger durch die Infektionserreger selbst, sondern durch eine Dysregulation der Immunantwort im Sinne einer überhöhten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine entstehen. Vor allem Rinder in der peripartalen Phase können somit durch eine intramammäre Infektion mit *E. coli* einen völligen Niederbruch der Milchleistung erleiden und unter Umständen zum Festliegen kommen. Nicht selten ist diese Form der Mastitis therapeutisch nicht mehr zu beeinflussen und es kommt zu Todesfällen oder langen Rekonvaleszenzphasen aufgrund der Folgen eines Toxin induzierten Schocksyndroms. Aus diesem Grund stellt sich die Frage, ob durch eine prophylaktisch ausgelöste Endotoxintoleranz der Verlauf dieser Erkrankung positiv zu beeinflussen ist, im Sinne einer bakteriziden Entzündung ohne Wirtsschädigung durch eine dysregulierte Immunantwort.

Als geeignetes Molekül zur intramammären Induktion einer Endotoxintoleranz wurde LPS ausgewählt. Das angeborene Immunsystem erkennt *E. coli* bekanntermaßen hauptsächlich TLR-vermittelt über LPS, dieses ist aber im Gegensatz zum gesamten Pathogen nicht vermehrungsfähig. Durch Auslösung der TLR-Signalkaskade werden zahlreiche entzündungsmodulierende Immunmediatoren reguliert. Zur Genexpression der TLRs bei der *E. coli*-Mastitis gibt es widersprüchliche Untersuchungen: Goldammer et al. (2004)<sup>156</sup> und Petzl et al. (2008)<sup>157</sup> berichten über eine erhöhte Expression von TLR-4-mRNA im Eutergewebe von *E. coli*-infizierten Kühen. Inwieweit diese Heraufregulation jedoch zu einer verbesserten Erregererkennung führt, bleibt spekulativ. Microarray-Experimente bei humanen PMN und Endothelzellen brachten hingegen keinen Hinweis auf die Hochregulation eines Gens vom TLR-4-Pfad<sup>303,304</sup>. Die Expression einiger Downstream-Signalgene, wie IL-8 und NF- $\kappa$ B, waren jedoch erhöht. Die gleichen Ergebnisse wurden für bovine Makrophagen<sup>305</sup> und bovine Euterepithelzellen<sup>35,36</sup> beobachtet. Mit den Ergebnissen muss vorsichtig umgegangen werden, da jeweils nur eine LPS-Konzentration bei einer relativ kurzen Inkubationsdauer angewandt wurde. Diese Daten legen nahe, dass die erhöhte TLR-4-Aktivität nicht von der transkriptionalen Aktivität abhängig ist, jedenfalls nicht bei kurzer Inkubationsdauer<sup>14,306</sup>. Zusätzlich wird berichtet, dass die TLR-4-Oberflächenexpression

unter Bedingungen der Endotoxintoleranz in murinen Makrophagen herunterreguliert wird<sup>216</sup>.

Die Auswirkungen einer Inokulation von LPS ins Euter laktierender Kühe sind bereits gut beschrieben: LPS löst dosisabhängig eine selbstlimitierende sterile Entzündung im Eutergewebe aus<sup>32,124</sup>.

Für die geplanten eigenen Versuche sollte ein *E. coli*-Stamm einer klinisch an Mastitis erkrankten Kuh verwendet werden. Dieser Keim wurde bereits im Vorfeld erfolgreich im bovinen Mastitis-Modell eingesetzt<sup>157</sup>. Für das „Priming“ wurde hochaufgereinigtes LPS aus genau diesem Modellkeim verwendet. Obwohl die TLR-vermittelte Erregererkennung als unspezifisch gilt, muss davon ausgegangen werden, dass Stamm- und Präparationsabhängige Unterschiede in der biologischen Aktivität von LPS an dieser Stelle von Bedeutung sein können. Da die hier erarbeiteten Ergebnisse nur auf einem Bakterienstamm basieren, wäre in zukünftigen Studien zu prüfen, ob eine intramammär induzierte Endotoxintoleranz mit unterschiedlichem LPS wie auch unterschiedlichen Bakterienstämmen zu vergleichbaren Effekten führen würde.

## 5.2 Etablierung eines Mastitis-Modells

Innerhalb der letzten Jahrzehnte wurden für zahlreiche Fragestellungen Mastitis-Modelle beim Rind eingesetzt. Die Auswahl der Anforderungen an das Tiermodell war in diesem Zusammenhang höchst unterschiedlich. Dabei kommt streng definierten Modellgrenzen hinsichtlich der Euter- sowie der Allgemeingesundheit eine entscheidende Bedeutung zu. Eine unterschiedliche lokale wie systemische immunologische Ausgangssituation schmälert die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Dies war insbesondere in Hinsicht auf die Untersuchung zur Endotoxintoleranz im Euter zu beachten. Im verwendeten Modell sollten nur allgemein-, wie eutergesunde Tiere gleicher Rasse, gleichen Alters, Laktationsstadiums und Sexualzyklusstands eingesetzt werden. Eine große Bedeutung wurde initial vor allem der Anzahl somatischer Zellen in der Milch beigemessen, da gezeigt werden konnte, dass initial erhöhte SCC-Werte die Entzündungssymptome bei natürlicher wie experimentell ausgelöster Mastitis abschwächen<sup>307,308</sup>.

Unter Praxisbedingungen ist der SCC ein wichtiger Indikator für die Eutergesundheit<sup>309</sup>. Es ist davon auszugehen, dass bereits ab einem Wert von  $>1 \cdot 10^5$  Zellen/ml Milch eine entzündliche Abwehrreaktion vorliegt<sup>310</sup>. Petzl (2005) beobachtete starke interindividuelle Unterschiede im Differentialzellbild der Milch bereits bei SCC-Werten  $<1 \cdot 10^5$  Zellen/ml<sup>297</sup>. Daher wählten wir als Maximalgrenze für unsere Versuche SCC-Werte von  $<5 \cdot 10^4$  Zellen/ml. Somit konnten wir eine größtmögliche Freiheit von entzündlichen Veränderungen garantieren, da Köß (2004) feststellen konnte, dass sich das Differentialzellbild in der Milch bereits ab  $>5 \cdot 10^4$  Zellen/ml zugunsten von PMN verschiebt<sup>311</sup>. Dies kann bereits als Hinweis auf eine entzündliche Veränderung gewertet werden. Tiere unter der Grenze von  $5 \cdot 10^4$  Zellen/ml Milch wiesen in eigenen Untersuchungen auch stets eine ähnliche Zusammensetzung der Zellen mit lymphoiden Zellen als prädominierendem Zelltyp auf (Daten nicht gezeigt). Den prozentualen Anteil an neutrophilen Granulozyten als Indikator für entzündliche Veränderungen heranzuziehen wurde bereits vorgeschlagen<sup>312</sup>. Dort wurde gezeigt, dass der Anteil an PMN während einer entzündungsbedingten Zunahme der Zellzahl stark mit dieser korreliert. Bei Studien der letzten 40 Jahre fällt immer wieder auf, dass Modellgrenzen so gewählt wurden, dass auch noch latente Infektionen und subklinische Mastitiden innerhalb der Modellgrenzen liegen können. Hierbei handelte es sich oftmals um Zellgehalte bis  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml, was kritisch zu bewerten ist. Die Milch eutergesunder Milchkühe moderner Zuchtrichtungen weist einen Zellgehalt um die  $2 \cdot 10^4$  Zellen/ml auf.

Unter den Milchzellen dieser Viertel dominieren die Lymphozyten. Es ist davon auszugehen, dass die Milchzellzahl jedoch keinesfalls über den Tag konstant bleibt und durch Ausmelkgrad, Fütterung, Stress, Außentemperatur sowie durch die ständige Auseinandersetzung mit eindringenden Bakterien auch in der gesunden Milchdrüse schwankt. Um dem Rechnung zu tragen wird in dem hier etablierten Modell eine maximale Obergrenze von  $5 \cdot 10^4$  Zellen/ml vor Versuchsbeginn nicht überschritten. Die Wahl dieser engen Modellgrenzen bereitete nicht unerhebliche Schwierigkeiten seitens der Verfügbarkeit des Tiermaterials. Dies mag ein Grund sein, weshalb solch stringente Kriterien bei Forschungsprojekten selten gefunden werden. Sie garantierten uns allerdings bestmögliche Ausgangsbedingungen für eine reproduzierbare Versuchsdurchführung und Ergebnisinterpretation. Auch die Resultate der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass auch zukünftige Studien über Fragestellungen zu Erreger-Wirts-Interaktionen in der bovinen Milchdrüse unter Berücksichtigung einer Zellzahl  $< 5 \cdot 10^4$  Zellen/ml Milch und hervorragend standardisierten Ausgangsbedingungen der Versuchstiere (siehe oben) durchgeführt werden müssen. Hier sind insbesondere die SCC-abhängigen Subpopulationenverschiebung der Milchleukozyten (siehe 4.3.8.1) und Sexualzyklustag-abhängige SCC-Veränderungen zu nennen (siehe 4.1.2).

Eine mindestens zweimalige bakteriologische Untersuchung der Milch im Herkunftsbetrieb im Abstand von mindestens einer Woche und zusätzlich eine bakteriologische Untersuchung zu Beginn des Versuchs (insgesamt in einem Zeitraum von 3 Wochen) sollten eine ausreichende Sicherheit hinsichtlich des Freiseins des Euters von bekannten euterpathogenen Bakterien gewährleisten<sup>313</sup>.

Da in der Literatur unterschiedliche Aussagen zur Beziehung von Zyklusstand zum SCC in der Milch zu finden waren<sup>306-308</sup>, führten wir hierzu noch eigene Untersuchungen durch<sup>300-302</sup>. Diese bewiesen, dass ein Einfluss des Zyklusstandes auf den Zellgehalt vorliegt und somit eine Beeinflussung von Abwehrvorgängen im Euter nicht auszuschließen ist. Wir hielten es deshalb wegen der Ergebnisreproduzierbarkeit für unverzichtbar, alle Tiere bei gleichem Zyklusstand zu infizieren. Der Zeitpunkt der Brunst ist dabei ein Tag, der im Zyklus zuverlässig festzumachen ist. Da unsere Voruntersuchungen zeigten, dass die Brunst keinen SCC-steigernden Effekt hat (siehe 4.1.2), terminierten wir den Zeitpunkt der Infektion mittels hormontherapeutischer Brunstsynchronisation genau auf den Zeitpunkt des Östrus. Zwei Hauptversuchsziele waren beim Design der Experimente zu vereinbaren: (1) eine möglichst präzise Dokumentation der Effekte der experimentellen Infektion und (2) die Gewinnung von Gewebeproben für die PCR-Analyse im infektionsnahen Zeitraum. Außerdem war es uns aus ethischen Gründen ein wichtiges Anliegen, die eingesetzten Versuchstiere optimal auszunutzen. Eigene und Versuche anderer Gruppen zur Mastitis ausgelöst durch *E. coli* zeigten, dass der Höhepunkt der klinischen Symptomatik 24h nach Infektion bereits überschritten ist<sup>13</sup>. Insbesondere die Maximalwerte der Körperinnentemperatur werden vor dem Zeitpunkt 24h nach Infektion gemessen. Daher wählten wir den Zeitraum von 24h zur Beobachtung der Etablierung einer Infektion. Danach erfolgten Schlachtung und Sammlung der Gewebeproben. Die Tiere, die 72h nach LPS-Inokulation mit *E. coli* infiziert wurden („72h priming“-Gruppe), zeigten durchweg zu diesem Zeitpunkt wieder fallende SCC-Werte. Die Tiere, die 10d nach LPS-Inokulation infiziert wurden („10d priming“-Gruppe), reagierten insgesamt sehr heterogen. Dem trugen wir Rechnung, indem eine zusätzliche Gruppe gebildet wurde, in der die Tiere nach „10d priming“ und 24h-Beobachtung nicht geschlachtet, sondern über den Zeitraum von 4 Wochen nach der Infektion beobachtet wurden.

In der Auswahl der Messzeitpunkte berücksichtigten wir eigene Erfahrungen von früheren Forschungsprojekten zur *E. coli*-Mastitis. Die engmaschigen klinischen Allgemein-

untersuchungen alle 3h in den ersten 18h nach LPS-Inokulation und nach der *E. coli*-Infektion ließen uns das Auftreten der klinischen Symptome zeitlich exakt feststellen und insbesondere eine sehr detaillierte Temperaturkurve erstellen (siehe 4.2.1). Zur Beurteilung der Milchleistung sowie des Milchsekrets und zur Erhebung des Palpationsbefundes am ausgemolkenen Euter war der 12-stündige Rhythmus durch die Melkzeiten vorgegeben. Neben dem Zellgehalt in der Milch wurden routinemäßig auch ein Auswahl relevanter Milchbestandteile bestimmt (siehe 3.3.12). Veränderungen der absoluten und relativen Zahl zirkulierender Leukozyten im Blut wurden als Indikator für stattfindende entzündliche Prozesse herangezogen. Ebenso die Differenzierung der Zellen in der Milch sollte immunologische Vorgänge im Euter während der Infektion näher charakterisieren und im Speziellen den Einfluss einer Vorbehandlung auf lokale Immunzellen in der Milchdrüse aufdecken.

Solange die Tiere an der Klinik für Wiederkäuer in Oberschleißheim aufgestellt waren, wurden sie durchweg von fachkundigem und mit den Versuchsmodalitäten vertrautem Personal versorgt sowie gemolken. In der Vorbeprobungsphase wurden zudem alle 12h rektale Temperatur, Milchleistung und Futteraufnahme der Tiere dokumentiert.

Damit wurden im vorliegenden Projekt äußerst strenge Modellgrenzen und ein sehr ausgefeiltes Probenentnahme- und Tierbeobachtungssystem hinsichtlich der Euter- sowie der Allgemeingesundheit angewendet, die eine sehr gute Vergleichbarkeit der Tiere und der Ergebnisse innerhalb und zwischen den Gruppen ermöglichen.

### **5.3 *In vivo*-Versuche zum intramammären „LPS-Priming“**

#### **5.3.1 Direkte LPS-Effekte**

Effekte der Inokulation von LPS in die Euter laktierender Milchkühe sind aus zahlreichen Versuchen gut dokumentiert<sup>29</sup>. Die Dosierung des LPS sollte in dieser Studie zur Induktion und Erforschung der Endotoxintoleranz so gewählt werden, dass keine Störungen des Allgemeinbefindens und nur milde Anzeichen einer Entzündung am Euter ausgelöst werden.

Die Tiere reagierten nach der Inokulation von LPS in das Euter sehr einheitlich. Die rektal gemessene Körpertemperatur der Versuchstiere stieg durchweg an und erreichte ihren Höhepunkt zwischen Stunde 6 und 9 nach der intramammären LPS-Inokulation. Die Versuchstiere zeigten einen Anstieg im SCC mit den höchsten Werten zur Stunde 12 nach Stimulation. Von diesem Zeitpunkt an fielen die SCC-Werte kontinuierlich ab: 72h nach der LPS-Inokulation waren die Werte noch erhöht, 240h nach der Inokulation waren die Ausgangswerte nahezu wieder erreicht (siehe 4.2.4). Das Milchsekret zeigte nur bei einzelnen Tieren geringgradige Abweichungen von der physiologischen Beschaffenheit in Form vereinzelter Flocken oder wässrigen Milchcharakters. Diese abweichenden Sekretbefunde beschränkten sich dabei auf die ersten 10ml des Viertelanfängsgemelks, was allgemein als eine schwache klinische mammäre Entzündungssituation eingeschätzt wird. Bemerkenswert ist, dass einzelne Tiere wiederholt Abweichungen im Eutersekret zeigten, während zwischendurch das Sekret unauffällig erschien. Keines der Tiere zeigte während der „Priming-Phase“ Störungen des Allgemeinbefindens oder starke Auslenkungen des Differentialblutbildes, die jeweils ein Hinweis auf systemische Effekte des „Primings“ wären. Insgesamt deckte sich die Reaktionsweise auf das LPS in etwa mit in der Literatur beschriebenen Angaben<sup>29</sup>. Die klinische Symptomatik war jedoch vergleichsweise schwach. Die LPS-Dosierung (1µg pro Euterviertel) war jedoch auch deutlich geringer, als bei in der Literatur beschriebenen Versuchen (meist 100µg pro Euterviertel). Es bleibt die Frage offen,

ob durch eine weitere Reduzierung der LPS-Dosis die Nebenwirkungen (SCC-Anstieg) noch weiter hätten gesenkt werden und trotzdem eine Endotoxintoleranz hätte erzielt werden können.

### 5.3.2 Ohne „LPS-Priming“ ist die Reaktion auf eine *E. coli*-Infektion einheitlich

Voraussetzung dafür, Versuche zur Wirkung des „LPS-Primings“ auf eine nachfolgende *E. coli*-Infektion durchführen zu können, war eine Kontrollgruppe, bei der unter identischen Bedingungen ein *E. coli*-Challenge ohne „LPS-Priming“ stattfand. Zu diesem Zweck wurden 5 Tiere mit denselben strikten Ausgangsbedingungen mit *E. coli* infiziert, über 24h beobachtet und dann geschlachtet. Diese Tiere reagierten sehr einheitlich auf die *E. coli*-Infektion. Alle Tiere zeigten nach 12h Fieber ( $\bar{x}$  41,14 ± 0,47°C) und ein gering- bis mittelgradig gestörtes Allgemeinbefinden. Der Zellgehalt war nach 12h bereits sehr stark erhöht (ca.  $\bar{x}$  2,07 [1,19-2,26]\*10<sup>6</sup> Zellen/ml Milch); alle Tiere zeigten ein deutlich verändertes Milchsekret (siehe 4.3.5). Die infizierten Euterviertel waren 12h nach der Infektion bereits deutlich vergrößert und ödematös geschwollen. Die Beobachtungen decken sich mit Angaben aus der Literatur<sup>4,157</sup>. Durch die Einheitlichkeit der Symptome und der zeitlichen Dynamik bieten diese Tiere als Kontrollgruppe für die Versuchsgruppen damit ideale Voraussetzungen.

### 5.3.2 „LPS-Priming“ beeinflusst die Reaktion auf eine experimentelle *E. coli*-Infektion

Tiere, die 72h nach „LPS-Priming“ mit *E. coli* intramammär infiziert wurden, wiesen keine Etablierung der Infektion auf. Die Tiere dieser Gruppe reagierten sehr einheitlich mit einer nur kurzzeitigen Erhöhung des Zellgehalts, der bereits 24h nach der Infektion die Ausgangswerte fast wieder erreichte (siehe 4.3.7). Bei der Differenzierung der Zellen war ebenfalls kaum eine Reaktion zu erkennen (PMN-Anstieg). *E. coli* war nur bei einem Tier aus der Milch reisolierbar; die anderen 4 Tiere blieben in der bakteriologischen Untersuchung durchgängig negativ. Kein Tier zeigte Störungen der Milchsekretion oder des Allgemeinbefindens. Bei der statistischen Analyse ergaben sich deshalb nahezu bei allen Parametern signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe ohne „LPS-Priming“ (siehe 4.3). Insgesamt sind diese Effekte der LPS-Vorbehandlung 72h vor der Infektion klar als eine protektive Wirkung zu bewerten. Es bleibt die Frage, ob der Effekt auf dem höheren Ausgangszellgehalt der Milch beim *E. coli*-Challenge beruht. Ist, mit anderen Worten, die Linderung der Krankheitssymptome auf eine erhöhte zelluläre Abwehrkapazität in der Milch zurückzuführen, die verhinderte, dass sich *E. coli* im Euter etablieren kann, oder handelt es sich um einen Endotoxintoleranz-Effekt auf Ebene der Milchdrüsenepithelzellen. Gegen einen rein Zellzahl-bedingten Effekt spricht, dass es in anderen Untersuchungen problemlos gelungen ist, bei Tieren mit einem vergleichbar hohen Milchzellgehalt erfolgreich eine *E. coli*-Mastitis zu etablieren<sup>4</sup>.

Die „10d priming“-Tiere zeigten dagegen eine weit größere Heterogenität in ihren Reaktionen auf die nachfolgende *E. coli*-Infektion als die „72h priming“-Tiere. In der Summe lässt sich sagen, dass die Mastitis bei allen Probanden klinisch abgeschwächt war, die Infektion sich aber klar etablieren konnte. Die Tiere zeigten auf den infizierten Vierteln einen höheren Anstieg des Zellgehalts als die „72h priming“-Gruppe (siehe 4.3.7), allerdings auch einen weitaus langsameren SCC-Anstieg als die Kontrollgruppe („no priming“). Die Infektion etablierte sich als klinische Mastitis teilweise sehr viel später als bei der Kontrollgruppe, z.T. noch bis 12d nach dem ersten Pathogenkontakt. So zeigten 3 Tiere in den ersten 24h nach der Infektion noch keine klinischen Symptome, entwickelten aber später doch noch eine Mastitis. Außerdem kam es bei einem Tier zu einer rezidivierenden Mastitis (siehe Tabelle 9). Bei den Tieren der Kontrollgruppe kam es dagegen stets schon innerhalb der ersten 24h zu einer



klinischen Mastitis. Bemerkenswert ist allerdings auch, dass die funktionellen Depressionen am Euter aller „10d priming“-Tiere voll reversibel waren. So fanden die Tiere aus der „10d priming“-Beobachtungsgruppe nach überstandener Mastitis und Keimeliminierung zügig wieder zur Ausgangsmilchleistung zurück. Zu diesem Punkt fehlen vergleichbare „ungeprimte“, *E. coli*-infizierte Tiere aus Tierschutzgründen und der Limitation verfügbarer Versuchstiere.

Bei der kulturellen Reisolierung der Bakterien aus der Milch und bei den Sekretbefunden ließen sich auch statistisch signifikante Unterschiede zwischen der „10d priming“-Gruppe und der „no priming“-Gruppe feststellen (siehe 4.3.6, 4.3.5). Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine initiale Elimination der inokulierten Pathogene zunächst schneller und effektiver bei „geprimten“ Tieren stattfand. Der noch sehr viel geringere Nachweis an *E. coli* in der „72h priming“-Gruppe bestärkt diese Schlussfolgerung. Dies deckt sich indirekt mit Beobachtungen aus der Literatur, wo beschrieben wird: Je früher *E. coli* im Euter von Seiten des Wirts bekämpft wird, desto geringer ist die Vermehrungsrate des Pathogens und desto geringer fällt der Schweregrad der Erkrankung aus<sup>314</sup>.

Die Abschwächung der systemischen Effekte des *E. coli*-Challenge dokumentierte sich auch in einer entsprechenden Dynamik der Blutleukozytenghalte: Eine Leukopenie wie bei den „ungeprimten“ Tieren blieb bei beiden „geprimten“ Gruppen aus. Nach der Infektion weisen dabei beide „priming“-Gruppen statistisch signifikant höhere Leukozytenwerte als die Tiere der Kontrollgruppe auf (siehe 4.3.3). Dies zeigt auch, dass das „LPS-Priming“ effektiv die systemischen Auswirkungen der Entzündung eingrenzen kann und somit einen vielversprechenden Ansatz bietet, prophylaktisch einem systemischen Toxin-induzierten Schocksyndrom beim Rind entgegenzuwirken.

In der Gesamtbetrachtung lässt sich 10d nach dem „Priming“ immer noch ein deutlicher Effekt auf eine nachfolgende Infektion feststellen. Dieser Effekt lässt sich durch einen erhöhten Zellgehalt in der Milch allein nicht erklären, da der Milchzellgehalt und auch die Zellzusammensetzung 10d nach der LPS-Inokulation die basalen Ausgangswerte wieder erreicht hatten und das Zellbild der Sekretion eines gesunden Euters gleichete. Auch im Eutergewebe scheinen unter Endotoxintoleranz die Expression von Zytokinen und die Regulation der TLR-Kaskade insoweit verändert zu sein, dass eine Infektion mit einem Pathogen nicht mehr die Wirkung erzielen kann wie im naiven Euter<sup>287</sup>. Hier werden in diesem Zusammenhang gewonnene Gewebeproben Zielweisende Ergebnisse liefern, um Regulationspfade und Zielmoleküle aufzudecken.

### 5.3.3 Protektive Effekte des „LPS-Priming“ im Euter sind zeitlich begrenzt

Festzustellen blieb, ob der Mechanismus der Endotoxintoleranz wie in der Literatur für andere Körperkompartimente beschrieben, auch im Euter zeitlich begrenzt ist<sup>266</sup>. Die „72h priming“-Tiere zeigten einen signifikant besseren Schutz gegen eine Mastitis als Tiere, die 10d nach LPS-Vorbehandlung infiziert worden waren. Offensichtlich hatte dieser Schutz nach 10d bereits deutlich abgenommen. Aufgabe weiterer Forschungsvorhaben wird es sein, die maximalen zeitlichen Grenzen auszuloten, um für praktische Anwendungen die Schutzphase so lang wie möglich zu gestalten.

Die heterogenen klinischen Verläufe der „10d priming“-Gruppe im Beobachtungszeitraum über 4 Wochen zeigen, dass die Endotoxintoleranz und damit die Schutzphase gegenüber einer Mastitis offensichtlich individuell recht unterschiedlich ist. Der Zeitraum deckt sich dabei gut mit Angaben aus der Humanmedizin, wo als Höchstdauer für die Endotoxintoleranz etwa 3 Wochen angegeben werden<sup>266</sup>. Nach dieser Zeit ist das LPS durch die Acyloxyacyl-

Hydrolase-Aktivität der zirkulierenden PMN detoxifiziert<sup>269,270</sup>. Möglicherweise gibt es interindividuelle Unterschiede zwischen einzelnen Tieren in der Aktivität der Acyloxyacyl-Hydrolase. Es könnte auch sein, dass Kuh-assoziierte Faktoren bei größerem Abstand zum „LPS-Priming“ eine zunehmend bedeutendere Rolle spielen, da auch für die natürliche intramammäre Infektion mit *E. coli* bekannt ist, dass Wirtsfaktoren ausschlaggebend für den Schweregrad der Erkrankung sind.

Unerwartet war das Auftreten einer rezidivierenden *E. coli*-Mastitis 10d nach der Infektion, auch wenn dies zunächst als Einzelfall eingeordnet werden kann. Möglicherweise hat die Endotoxintoleranz-bedingte Dämpfung initialer Entzündungsvorgänge dazu geführt, dass nicht alle Erreger eliminiert wurden. Erkenntnisse aus der Humanmedizin zur Endotoxintoleranz deuten daraufhin<sup>280,281</sup>. Andererseits ist hervorzuheben, insbesondere durch die Wiederherstellung der vollen Milchleistung auch auf dem infizierten Viertel bei den Tieren dieser Gruppe, dass das „LPS-Priming“ ein praktisch nützlicher Schutzmechanismus gegen die *E. coli*-Mastitis sein kann.

#### **5.3.4 „LPS-Priming“ beeinflusst die Reaktion nicht infizierter Viertel auf eine *E. coli*-Infektion benachbarter Euterviertel**

Einen Hinweis, dass die immunologische Ausgangssituation bei Infektion in „geprimten“ und „nicht geprimten“ Eutervierteln unterschiedlich ist, liefern auch die Verläufe der Milchzellgehalte der nicht infizierten Viertel (siehe 4.3.7). Während bei der Kontrollgruppe („no priming“) auf den nicht infizierten Vierteln nach der Infektion keine Zellzahlveränderungen festzustellen waren, sah man bei nahezu allen „geprimten“, nicht infizierten Vierteln einen SCC-Anstieg 12h nach der Infektion. Bei einem Tier waren sogar Sekretveränderungen (Flockenbildung) auf „geprimten“, nicht infizierten Vierteln festzustellen. Offensichtlich liegt in den „geprimten“ Vierteln eine veränderte Reaktionsbereitschaft vor, die vermutlich dazu führt, dass sich eine Infektion nicht in dem Maße etablieren kann, wie sie es im naiven Euter tun kann. In ähnlichem Zusammenhang ist aus anderen Studien dieses Phänomen als „Crosstalk“ bekannt. Hier wurde festgestellt, dass eine intramammäre *E. coli*-Infektion in einem Viertel die Reaktionslage benachbarter Viertel auf eine später gesetzte Infektion im Sinne einer Dämpfung der Entzündungsreaktion beeinflusst<sup>157</sup>. Möglicherweise lockt das in Alarmbereitschaft versetzte Eutergewebe bei einer Infektion in einem anderen Viertel durch die veränderte Expression von Entzündungsmediatoren sofort auch verstärkt leukozytäre Zellen in das Eutergewebe und/oder versetzt lokale Wächterzellen (Epithelzellen, Makrophagen, dendritische Zellen) in erhöhte Reaktionsbereitschaft. Bei der Analyse der einzelnen Zellpopulationen fiel auf, dass im Differentialzellbild der Milch „geprimter“ Euterviertel starke morphologische Veränderungen der PMN (Verlust der Granularität, Größenzunahme) zu beobachten waren (siehe 4.3.8.1). Es ist beschrieben, dass die proinflammatorischen Mediatoren Platelet-Activating Factor (PAF) und TNF- $\alpha$  eine Größenzunahme boviner PMN bewirken<sup>315</sup>. Auch die Stimulation mit PAMPs *in vitro* führte zu einer Verminderung der Granularität von PMN<sup>297,316</sup>. Dieser Granularitätsverlust kann als Indikator der Zellaktivierung interpretiert werden, die sich in der Verschmelzung der Granula mit der Zellmembran zur Abgabe der Inhalte in den Extrazellularraum äußert. Neben einer Aktivierung kann auch die Induktion der Apoptose zu morphologischen Veränderungen neutrophiler Granulozyten führen<sup>317</sup>. Ein Apoptose-bedingter Verlust der Granula und eine Verringerung der Zellorganellen boviner PMN aus dem Eutergewebe *in vitro* ähneln morphologischen Alterationen *in vivo*<sup>318</sup>.

Hier zeigt sich ein Phänomen, das durchaus eine Potenz zur Nutzung für gezielte protektive Behandlungsmaßnahmen in zukünftigen Prophylaxe Konzepten haben könnte.

### 5.3.5 Differenzierung immigrierender Milch-Leukozyten nach „LPS-Priming“ und *E. coli*-Infektion

Die Differenzierung der immigrierenden Milch-Leukozyten im vorliegenden Projekt bestätigte, dass mit steigender Zellzahl in den Vierteln der Anteil an PMN überproportional zunimmt und schließlich zur dominierenden Zellpopulation wird (siehe 4.3.8.2). Dies deckt sich mit den Beobachtungen einer kürzlich veröffentlichten Studie<sup>319</sup>. In der Verteilung der Zellpopulationen fällt auf, dass „LPS-geprimte“ Viertel nach 10 Tagen nicht nur den Milchzellgehalt wie vor dem „Priming“ aufweisen, sondern auch zur gleichen Verteilung der Zellpopulationen mit einer Dominanz der Lymphozyten zurückkehren. Die anfangs geschilderte Situation, dass die Verteilung der Milchzellpopulationen stark mit der Höhe der Zellzahl korreliert, gilt hier also genauso. Festzustellen ist weiterhin, dass sich das Verhältnis der CD4+/CD8+-Lymphozyten nach dem „Priming“ zugunsten der CD4+-Zellen verschiebt. Verschiebungen dieses Verhältnisses werden in der Humanmedizin seit längerer Zeit im Zusammenhang mit unterschiedlichen Erkrankungen untersucht. Für die Mastitis des Rindes liegen hierzu noch sehr wenige Informationen vor. Mehrzad et al. (2008)<sup>320</sup> beschreiben, dass nach einer Infektion mit *E. coli* in den ersten 24h sich die CD4+/CD8+-Ratio zugunsten der CD8+-Zellen in der Milch verschiebt und erst nach 72h sich das Verhältnis zugunsten der CD4+-Zellen entwickelt. Diese Dynamik konnten wir bei der Inokulation von LPS nicht darstellen. Hier überwog nach dem „Priming“ ganz klar der Influx von CD4+-Zellen. Auch nach der Infektion der „geprimten“ Viertel zeigte sich eine andere Dynamik als dies bei Mehrzad et al. (2008) für naive Euterviertel beschrieben wurde. Offensichtlich zeigen die Lymphozyten auf den Kontakt mit LPS allein und auf eine Infektion unter Endotoxintoleranz eine andere Influx-Dynamik, als auf eine *E. coli*-Infektion im naiven Euter. Die Rückkehr zu den Verhältnissen vor dem „Priming“ dauert dabei erstaunlich lange; erst nach 10 Tagen sind hier die Ausgangsbedingungen weitgehend erreicht. Nach der *E. coli*-Infektion lässt sich dann keine signifikante Veränderung im CD4+/CD8+-Verhältnis feststellen. Aufgrund von versuchstechnischen Gründen wurde im vorliegenden Projekt das CD4+/CD8+-Verhältnis in der „72h priming“- und „no priming“-Gruppe nicht bestimmt. Entsprechende weiterführende Analysen sind jedoch notwendig, um einerseits die konträren Beobachtungen zu Veränderungen des Verhältnisses von CD4+/CD8+-Milchlymphozyten im Rahmen der beginnenden Entzündung aufzuklären und andererseits die mögliche Bedeutung des selektiven CD4+-Zellinfluxes für die beobachteten Endotoxintoleranzeffekte herauszuarbeiten. Vorerst bleibt die Interpretation der Beobachtungen spekulativ. Ebenso bedarf die Interpretation der Bedeutung der Zunahme der Makrophagen in der frühen Infektionsphase (siehe 4.3.8.2) weitergehender Untersuchungen.

### 5.4 Schlussbetrachtungen und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, mit LPS den Entzündungsverlauf einer nachfolgenden *E. coli*-Infektion positiv zu beeinflussen. Dies ist das Hauptergebnis der Studie und öffnet neue Wege für die Erarbeitung neuer Mastitisprophylaxekonzepte. Grundsätzlich nachteilig für den Einsatz eines TLR-Agonisten wie LPS als Immunmodulator ist, dass er zumindest in der eingesetzten Dosierung durch die Toxizität nicht frei von Nebenwirkungen ist. Die, wenn auch vorübergehende, Minderung der Milchqualität durch erhöhten Zellgehalt und Veränderung der makroskopischen Beschaffenheit ist natürlich kritisch zu betrachten, könnte jedoch insbesondere für die kurz postpartale Phase in eine akzeptable Form gebracht werden. Andererseits schränkt die begrenzte Wirkungs-/Schutzphase die Anwendungsmöglichkeiten ein. Offensichtlich sind TLR-Agonisten jedoch äußerst potente Immunmodulatoren, mit denen sich die Dysregulierung der Immunantwort bei der *E. coli*-

Mastitis eingrenzen lässt. Dies allein kann schon als großer Erfolg gewertet werden und rechtfertigt weitere Aktivitäten auf diesem Gebiet.

Für weitere Forschungsvorhaben bleibt zu untersuchen, ob bei gleich bleibender oder prolongierter Wirkung die Toxizität und damit Nebenwirkungen verringert werden können. Ein Ansatz dazu wäre der Einsatz von Teilen von TLR-Agonisten, zum Beispiel isoliertes Lipid-A von LPS<sup>14</sup>, oder von synthetischen PAMPs. Könnten die Nebenwirkungen damit gesenkt werden, wäre auch eine mehrmalige Anwendung denkbar. Damit ließe sich der Zeitraum nach Bedarf verlängern, in dem ein Schutz gegen die Pathogene besteht.

Konzeptionell stellt sich auch die Frage, ob LPS zum „Priming“ wie hier besser intramammär zu geben ist oder ob eine systemische Anwendung den besseren Erfolg bringt. Ergebnisse aus Versuchen bei der Maus legen nahe, dass die TLR-4-Expression auf den Euterepithelzellen wichtiger ist als auf den zu rekrutierenden PMN. Eine intramammäre Applikation scheint also das Mittel der Wahl sein<sup>14</sup>. Ein unerwünschter Nebeneffekt ist hierbei wie erwähnt die Erhöhung der Zellzahl. Positiv zu bewerten ist, dass die Milchleistung durch das lokale „LPS-Priming“ nicht beeinflusst wird.

Offen bleibt die Frage, inwieweit spezifische immunologische Vorgänge im peripartalen Zeitraum die Anwendung von TLR-Agonisten beeinflussen. Im Hinblick auf eine Anwendung bei Milchrindern wäre sicher der peripartale Zeitraum der mit der größten Relevanz, da speziell in diesem Zeitraum die Dysregulation der immunologischen Vorgänge die größten Schäden am Tier hervorrufen kann. Hier herrschen jedoch schon auf den ersten Blick deutlich andere Ausgangsbedingungen. Kolostralsekret weiß bekanntlich einen deutlich erhöhten Zellgehalt und eine zur Milch im späteren Laktationsstadien verschiedene Zusammensetzung auf<sup>321</sup>. Über den Einfluss der Gamma-Globuline auf Endotoxin-vermittelte Mechanismen lässt sich im Moment nur spekulieren, wie auch über den Einfluss einer prophylaktischen LPS-Gabe auf die Qualität des Kolostrums. Die Perspektiven für den Einsatz von TLR-Agonisten im Zusammenhang mit der Eutergesundheit müssen nicht auf den alleinigen intramammären Einsatz beschränkt bleiben: In einem aktuell anlaufenden Projekt wird deren Eignung als Vakzine-Adjuvantien bei der Mastitisprophylaxe untersucht. In der Humanmedizin werden sie bereits mit dieser Zielsetzung in der Tumorthherapie eingesetzt<sup>322</sup>. Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es noch keine Daten zur Bedeutung der LPS-Diversität auf den Behandlungseffekt. Die große Anzahl an Serotypen bei *E. coli* verlangt für eine Praxisrelevanz ein breites Wirkungsspektrum. Ideal für eine Anwendung in der Praxis wäre sogar eine effektive Wirkung bei einem großen Spektrum an relevanten Bakterienspezies. Fernziel entsprechender Entwicklungsarbeiten könnte in diesem Sinne der kombinierte Einsatz detoxifizierter TLR-Agonisten sein, die ein möglichst weites Spektrum mastitisrelevanter PAMPs repräsentieren.

Abschließend lässt sich feststellen, dass mit den vorliegenden Ergebnissen Wegweisende Erkenntnisse zu Mechanismen der Endotoxintoleranz in der bovinen Milchdrüse erarbeitet wurden. Auf deren Basis weitergehende Untersuchungen sollen im Rahmen eines Gesamtkonzepts zur Erforschung früher Erreger-Wirtsinteraktionen im Euter zur Entwicklung neuer prophylaktischer und therapeutischer Ansätze bei der Bekämpfung des Krankheitskomplexes Mastitis führen.

## 6 Zusammenfassung

Die Mastitis des Rindes stellt eine der bedeutendsten Einzeltierkrankungen in der Milchproduktion dar, für die es bisher nur unbefriedigende Prophylaxe- und Therapiekonzepte gibt. Speziell die durch *Escherichia coli* (*E. coli*) ausgelösten Mastitiden können im peripartalen Zeitraum einen perakuten, z.T. letalen Verlauf nehmen und zeichnen sich auch im Falle des Überlebens durch eine starke Wirtsschädigung aus. Ein zentrales Problem hierbei ist die überschießende Reaktionsweise des Wirts, die durch eine Dysregulation des angeborenen Immunsystems verursacht wird.

Kommt ein Wirt innerhalb eines bestimmten Zeitraums nach einer Infektion erneut mit dem Erreger oder dessen Bestandteilen (PAMPs; engl. pathogen-associated molecular patterns) in Kontakt, so reagiert er oft mit einer deutlich herabgesetzten Immunantwort. Dieser als „Endotoxintoleranz“ bekannt gewordene Mechanismus wurde bereits beim Menschen und einigen Säugetierspezies untersucht. PAMPs werden über hochkonservierte Erreger-Erkennungs-Rezeptoren (Toll-like-receptors, TLRs) erkannt, die die sich anschließende Entzündungsreaktion einleiten. Bei der akuten *E. coli*-Mastitis gilt dies als Schlüsselmechanismus der Pathogenese: Der Zellwandbestandteil Lipopolysaccharid (LPS) von *E. coli* wird über TLR-4 erkannt. Im Anschluss daran kommt es durch proinflammatorische Signale zur entzündlichen Reaktion.

Ziel dieser Studie sollte es sein, im Rahmen eines wissenschaftlichen Gesamtkonzeptes zu untersuchen, ob die akute klinische Mastitis gezielt verhindert oder abgeschwächt werden kann. Zu diesem Zweck sollten induzierbare TLR-vermittelte Toleranzmechanismen über eine Vorbehandlung von Kühen mit LPS analysiert werden. Die Experimente schlossen die Charakterisierung der Reaktionsweise des vorbehandelten Wirts auf eine nachfolgende experimentelle intramammäre Infektion mit *E. coli* ein.

Die *in-vivo*-Untersuchungen zu mammären immunologischen Mechanismen erfordern grundsätzlich gut standardisierte Versuchstiere. In dieser Studie wurde deshalb großes Gewicht auf ein streng definiertes Tiermodell gelegt. Ausschließlich erstlaktierende Kühe der Rasse Holstein-Friesian, die vorberichtlich noch nie an einer Mastitis erkrankt waren und auf allen Vierteln einen Zellgehalt (somatic cell count, SCC) von <50.000 Zellen/ml Milch aufwiesen, kamen zum Einsatz. Da wir zeigen konnten, dass der SCC Sexualzyklus-abhängig schwankt, wurden alle Versuchstiere Zyklus-synchronisiert. Die experimentelle *E. coli*-Infektion erfolgte jeweils in der Brunst. In den Versuchsgruppen wurden zu Versuchsbeginn alle Euterviertel jeweils mit 1µg LPS vorbehandelt („Priming“). 72h (n=5) oder 10d (n=10) später erfolgte die experimentelle Infektion mit 500CFU *E. coli* des jeweils zellniedrigsten Viertels. Eine Kontrollgruppe (n=5) wurde ohne „Priming“ infiziert. Bei den Kontrolltieren kam es stets zu einer akuten klinischen Mastitis innerhalb der ersten 14h nach der *E. coli*-Infektion: Alle Tiere zeigten invariant Fieber, Euterschwellung, makroskopisch deutlich verändertes Milchsekret, gering- bis mittelgradige Beeinträchtigungen des Allgemeinbefindens sowie Leukopenie. Der SCC stieg bei allen Tieren sehr stark an. *E. coli* war zu jedem Messzeitpunkt in relativ hoher Anzahl in der Milch nachweisbar. Im starken Gegensatz hierzu entwickelten die 72h vor Infektion mit LPS „geprimten“ Tiere bei ungestörtem Allgemeinbefinden keine klinische Mastitis. Das Eutersekret wie auch die Milchleistung blieben unverändert. Der SCC stieg in den infizierten Vierteln innerhalb von 24h nur schwach an; das Differentialblutbild blieb unverändert. Es konnte nur in einem Fall

bei einer Kuh *E. coli* aus der Milch reisolieren. Die Gruppe, die 10d nach dem „Priming“ mit *E. coli* infiziert wurde, reagierte sehr viel heterogener. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die klinischen Symptome in dieser Gruppe schwächer, im Vergleich zur 72h „geprimten“ Gruppe jedoch stärker. Die Tiere zeigten auf dem infizierten Viertel einen höheren Anstieg des SCC als die über 72h „geprimte“ Gruppe, allerdings auch einen weitaus langsameren Anstieg als die „ungeprimten“ Tiere. Dies machte es erforderlich, den Beobachtungszeitraum bei 5 weiteren Probanden (10d „Priming“ mit nachfolgender *E. coli*-Infektion) auf insgesamt 4 Wochen auszuweiten. Dabei zeigte sich, dass sich die Infektion teilweise weitaus später als bei der Kontrollgruppe etablierte. Noch bis zum 10. Tag nach Inokulation von *E. coli* waren in einzelnen Fällen moderate lokale Krankheitserscheinungen und der Erreger im Milchsekret nachweisbar. Eine wichtige Beobachtung war jedoch, dass es in keinem Fall zu Störungen des Allgemeinbefindens kam oder irreversible Schäden am Euter zurückblieben. Alle Tiere erreichten nach überstandener Infektion ihre Ausgangsmilchleistung wieder. Darüber hinaus wirkte sich die Mastitis, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, nie auf das Differentialblutbild aus.

Diese Ergebnisse belegen erstmals, dass eine lokal induzierte immunologische Toleranz durch LPS bei der Mastitis des Rindes eine protektive Rolle spielen kann. Die Schutzphase war unter den gewählten Bedingungen jedoch begrenzt.

Während der „LPS-Primingphase“ kommt es zu nur geringgradigen vorübergehenden Nebenwirkungen: 6-9h nach dem „Priming“ zeigten alle Kühe eine leichte Temperaturerhöhung. Auch der SCC stieg in allen Vierteln nach 12h auf 3 bis  $9 \cdot 10^6$  Zellen/ml Milch an, erreichte aber bereits nach 72-168h annähernd das sehr niedrige Ausgangsniveau wieder ( $<50.000$  Zellen/ml Milch).

Erstmals konnte damit in diesem Projekt *in vivo* gezeigt werden, dass sich die akute klinische Mastitis durch *E. coli* durch gezielte Vorbehandlung mit LPS zeitabhängig verhindern oder dämpfen lässt. Diese wegweisenden Experimente stellen damit einerseits Basisdaten, andererseits auch hervorragend definiertes Material zur weiteren Erforschung der Endotoxintoleranz in der bovinen Milchdrüse bereit. Im Rahmen dieser Studie gewonnene Gewebeproben sollen im Nachfolgeprojekt mittels holistischer Verfahren neue Moleküle und Mechanismen früher „Erreger-Wirtsinteraktionen“ und Toleranzmechanismen aufdecken. Deren Kenntnis und gezielte Modulation sind die Basis für Entwicklungsarbeiten an neuen Konzepten für die Mastitis-Prophylaxe.

## 7 Summary

Tobias Pfister (2009): *Investigations into endotoxin induced tolerance mechanisms in acute bovine mastitis*

Mastitis is one of the most important diseases in milk producing dairy cattle. Up to now, existing concepts for prophylaxis and therapy of this condition are unsatisfactory. Especially clinical cases, that are caused by *E. coli* infection during the periparturient period, can lead to a peracute condition, sometimes with a lethal outcome. However, even in the case of survival there are commonly serious long-lasting damages observed in the affected animal. They are caused by an overreaction of the inflammatory system. The main underlying reason for this situation is the dysregulation of the innate immune system.

When the host animal is confronted again with the pathogen or its associated molecules (PAMPs; pathogen-associated molecular patterns) after a previous infection, the immune response might be markedly decreased. This mechanism, known as tolerance to endotoxins, has already been investigated in humans and other mammalian species. PAMPs are recognized via highly conserved pathogen-recognition-receptors (Toll-like-receptors, TLRs) that induce the consecutive inflammatory reaction. In acute *E. coli* mastitis this process is described as the key mechanism of pathogenesis: Lipopolysaccharide (LPS), a constituent of the *E. coli* cell wall is recognized by TLR-4, followed by the excretion of proinflammatory signals.

The aim of the current study was the evaluation of potential mechanisms, by which an acute clinical mastitis can be prevented or reduced in severity. Therefore, a TLR mediated tolerance in cattle induced by a preceding treatment with LPS should be analyzed. These experiments included the characterization of this reaction in the treated host in response to a consecutively experimentally induced intramammary infection with *E. coli*.

*In vivo* experiments investigating mammary immunologic mechanisms require of course standardized animals. Therefore the emphasis on this study was based on a well defined model. Only Holstein-Friesian cows in their first lactation and free from mastitis pathogens were used. The somatic cell count (SCC) was included as a criterion in these experiments. Since it has been demonstrated previously, that the SCC varies within the oestrous cycle all animals were synchronized before the *E. coli* infection was applied on the day of oestrus.

The animals of the experimental groups were initially treated with the local administration of 1µg LPS (“priming”) into all four quarters. 72 hours (n=5) or 10 days (n=10) later the infection was set by administration of 500CFU *E. coli* into the quarter with the lowest cell count. Animals of the control group (n=5) were infected without “LPS priming”. In these cows we observed acute clinical mastitis 14h after *E. coli* inoculation. All control animals showed fever, inflamed udder tissue and macroscopically changed milk secretion. Their general condition was reduced and haematologically a leukopenia was observed. The SCC increased in all animals ( $>8 \cdot 10^6/\text{ml}$ ). *E. coli* was found in the milk at every point in time in high numbers. In contrast animals “primed” with LPS 72h before the infection showed a normal general health condition and no clinical signs of mastitis. Both, the udder secretions as well as the milk yield were unchanged. The SCC increased only slightly in the infected quarters during a 24h period, the differential blood count was normal. In only one case *E. coli* could be isolated from milk. The group infected with *E. coli* 10d after “priming” reacted more

heterogeneously. The clinical symptoms were comparatively milder than in the control group, but more severe than in the 72h “primed” group. Although the cows showed higher SCC values of the infected quarter, than observed in the group “primed” 72h before infection, a slower SCC rise was observed here than in the “unprimed” control animals. This heterogeneity required both an extension of the group size (10d “priming” followed by *E. coli* infection) to include 5 additional animals as well as of the observation period to 4 weeks in total. In the “primed animals” an infection was established much later than in the control group. Before day 10 after inoculation with *E. coli* only moderate local disease was observed in accordance with smaller numbers of pathogens to be re-isolated from milk. It is noteworthy that in no case any disturbance of the general condition of the animals or irreversible injury of the udder tissue was seen. All “primed” cows returned to their normal milk yield. In addition mastitis never affected the differential blood count in contrast to the cows of the control group.

These results show for the first time, that an induced immune tolerance to LPS may play a protective role in the mastitis of cattle. The protection, however, was limited under the defined experimental conditions. During the “LPS priming phase” there are only transient secondary effects: 6-9h after “priming” all cows demonstrated slightly higher temperature. In addition, the SCC increased in all quarters 12h after infection to  $3-9 \times 10^6$  cells/ml milk. However, after 72 - 168h all animals returned to their initial low SCC value (50.000 cells /ml milk).

In summary it was demonstrated for the first time in dairy cows, that acute clinical mastitis can be prevented or reduced by stimulation of the innate immune system by LPS. Investigations of the tissues collected throughout this study will potentially uncover new molecules and mechanisms of pathogen-host-interactions and immune tolerance. The results provide the basis for new concepts in mastitis prophylaxis.



## 8 Literaturverzeichnis

1. Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, et al. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Vet Rec* 2007;160:253-257.
2. Olde Riekerink RG, Barkema HW, Kelton DF, et al. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci* 2008;91:1366-1377.
3. Bannerman DD, Goldblum SE. Direct effects of endotoxin on the endothelium: barrier function and injury. *Lab Invest* 1999;79:1181-1199.
4. Bannerman DD, Paape MJ, Lee JW, et al. Escherichia coli and Staphylococcus aureus elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:463-472.
5. West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: A review. *Crit Care Med* 2002;30:S64-S73.
6. Broad A, Jones DE, Kirby JA. Toll-like receptor (TLR) response tolerance: a key physiological "damage limitation" effect and an important potential opportunity for therapy. *Curr Med Chem* 2006;13:2487-2502.
7. Fehlings PDK. Kranke Euter kosten Geld. *Bayerisches Landwirtschaftliches Wochenblatt* 2008;198:22-24.
8. Pyorala S. Mastitis in post-partum dairy cows. *Reprod Domest Anim* 2008;43 Suppl 2:252-259.
9. Hill AW. Factors influencing the outcome of Escherichia coli mastitis in the dairy cow. *Res Vet Sci* 1981;31:107-112.
10. Hill AW, Shears AL, Hibbitt KG. The pathogenesis of experimental Escherichia coli mastitis in newly calved dairy cows. *Res Vet Sci* 1979;26:97-101.
11. Hogan J, Larry Smith K. Coliform mastitis. *Vet Res* 2003;34:507-519.
12. Wenz JR, Barrington GM, Garry FB, et al. Escherichia coli isolates' serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity. *J Dairy Sci* 2006;89:3408-3412.

13. Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, et al. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res* 2003;34:521-564.
14. De Schepper S, De Ketelaere A, Bannerman DD, et al. The toll-like receptor-4 (TLR-4) pathway and its possible role in the pathogenesis of *Escherichia coli* mastitis in dairy cattle. *Vet Res* 2008;39:5.
15. Nourshargh S, Perkins JA, Showell HJ, et al. A comparative study of the neutrophil stimulatory activity in vitro and pro-inflammatory properties in vivo of 72 amino acid and 77 amino acid IL-8. *J Immunol* 1992;148:106-111.
16. Burvenich C, Bannerman DD, Lippolis JD, et al. Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. *J Dairy Sci* 2007;90 Suppl 1:E39-54.
17. Janeway Charles A TP, Walport Mark *Immunobiology*. 6. Auflage ed: B&T, 2005.
18. Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect* 2002;4:837-851.
19. Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res* 2003;338:2431-2447.
20. Muroi M, Tanamoto K. The polysaccharide portion plays an indispensable role in *Salmonella* lipopolysaccharide-induced activation of NF-kappaB through human toll-like receptor 4. *Infect Immun* 2002;70:6043-6047.
21. Caroff M, Karibian D, Cavaillon JM, et al. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect* 2002;4:915-926.
22. Haeffner-Cavaillon N, Caroff M, Cavaillon JM. Interleukin-1 induction by lipopolysaccharides: structural requirements of the 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO). *Mol Immunol* 1989;26:485-494.
23. Vogel SN, Hogan MM. *Role of cytokines in endotoxin-mediated host responses*. Oxford: Oxford University Press, 1990.
24. West MA, Koons A. Endotoxin tolerance in sepsis: concentration-dependent augmentation or inhibition of LPS-stimulated macrophage TNF secretion by LPS pretreatment. *J Trauma* 2008;65:893-898; discussion 898-900.

25. Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, et al. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch Microbiol* 1995;164:383-389.
26. Rees DD, Celtek S, Palmer RM, et al. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;173:541-547.
27. Fenton MJ, Golenbock DT. LPS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol* 1998;64:25-32.
28. Condliffe AM, Kitchen E, Chilvers ER. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 1998;94:461-471.
29. Diez-Fraile A, Meyer E, Duchateau L, et al. L-selectin and beta2-integrin expression on circulating bovine polymorphonuclear leukocytes during endotoxin mastitis. *J Dairy Sci* 2003;86:2334-2342.
30. Schmitz S, Pfaffl MW, Meyer HH, et al. Short-term changes of mRNA expression of various inflammatory factors and milk proteins in mammary tissue during LPS-induced mastitis. *Domest Anim Endocrinol* 2004;26:111-126.
31. Bruckmaier RM, Weiss D, Wiedemann M, et al. Changes of physicochemical indicators during mastitis and the effects of milk ejection on their sensitivity. *J Dairy Res* 2004;71:316-321.
32. Lohuis JA, Kremer W, Schukken YH, et al. Growth of *Escherichia coli* in milk from endotoxin-induced mastitic quarters and the course of subsequent experimental *Escherichia coli* mastitis in the cow. *J Dairy Sci* 1990;73:1508-1514.
33. Lehtolainen T, Rontved C, Pyorala S. Serum amyloid A and TNF alpha in serum and milk during experimental endotoxin mastitis. *Vet Res* 2004;35:651-659.
34. Bannerman DD, Paape MJ, Baldwin RL, et al. Effect of mastitis on milk perchlorate concentrations in dairy cows. *J Dairy Sci* 2006;89:3011-3019.
35. Bruckmaier RM. Gene expression of factors related to the immune reaction in response to intramammary *Escherichia coli* lipopolysaccharide challenge. *J Dairy Res* 2005;72 Spec No:120-124.
36. Pareek R, Wellnitz O, Van Dorp R, et al. Immunorelevant gene expression in LPS-challenged bovine mammary epithelial cells. *J Appl Genet* 2005;46:171-177.

37. Bannerman DD, Paape MJ, Hare WR, et al. Increased levels of LPS-binding protein in bovine blood and milk following bacterial lipopolysaccharide challenge. *J Dairy Sci* 2003;86:3128-3137.
38. Lee JW, Paape MJ, Elsasser TH, et al. Elevated milk soluble CD14 in bovine mammary glands challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Dairy Sci* 2003;86:2382-2389.
39. Gay NJ, Keith FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991;351:355-356.
40. Mishra BB, Gundra UM, Teale JM. Expression and distribution of Toll-like receptors 11-13 in the brain during murine neurocysticercosis. *J Neuroinflammation* 2008;5:53.
41. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:499-511.
42. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002;169:10-14.
43. Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, et al. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol* 2000;165:7125-7132.
44. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 1999;285:736-739.
45. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999;11:443-451.
46. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, et al. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999;274:17406-17409.
47. Means TK, Wang S, Lien E, et al. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1999;163:3920-3927.
48. Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, et al. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol* 2001;166:15-19.

49. Coelho PS, Klein A, Talvani A, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. *J Leukoc Biol* 2002;71:837-844.
50. Opitz B, Schroder NW, Spreitzer I, et al. Toll-like receptor-2 mediates *Treponema* glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J Biol Chem* 2001;276:22041-22047.
51. Massari P, Henneke P, Ho Y, et al. Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J Immunol* 2002;168:1533-1537.
52. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2001;2:346-352.
53. Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, et al. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun* 2001;69:1477-1482.
54. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, et al. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999;401:811-815.
55. Asea A, Rehli M, Kabingu E, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 2002;277:15028-15034.
56. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413:732-738.
57. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998;282:2085-2088.
58. Kawasaki K, Akashi S, Shimazu R, et al. Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Biol Chem* 2000;275:2251-2254.
59. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 2000;1:398-401.

60. Rassa JC, Meyers JL, Zhang Y, et al. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:2281-2286.
61. Bulut Y, Faure E, Thomas L, et al. Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *J Immunol* 2002;168:1435-1440.
62. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, et al. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000;164:558-561.
63. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, et al. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 2002;277:15107-15112.
64. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001;276:10229-10233.
65. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, et al. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2002;195:99-111.
66. Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, et al. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol* 2002;168:5233-5239.
67. Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 2001;167:2887-2894.
68. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001;410:1099-1103.
69. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001;13:933-940.
70. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13766-13771.
71. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002;3:196-200.

72. Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, et al. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 2003;33:2987-2997.
73. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004;303:1526-1529.
74. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, et al. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004;303:1529-1531.
75. Jurk M, Heil F, Vollmer J, et al. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 2002;3:499.
76. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408:740-745.
77. Zhang D, Zhang G, Hayden MS, et al. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004;303:1522-1526.
78. Yarovinsky F, Sher A. Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 2006;36:255-259.
79. Baoprasertkul P, Xu P, Peatman E, et al. Divergent Toll-like receptors in catfish (*Ictalurus punctatus*): TLR5S, TLR20, TLR21. *Fish Shellfish Immunol* 2007;23:1218-1230.
80. Tobias PS, Tapping RI, Gegner JA. Endotoxin interactions with lipopolysaccharide-responsive cells. *Clin Infect Dis* 1999;28:476-481.
81. Schumann RR, Latz E. Lipopolysaccharide-binding protein. *Chem Immunol* 2000;74:42-60.
82. Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* 2002;23:301-304.
83. Ingalls RR, Arnaout MA, Golenbock DT. Outside-in signaling by lipopolysaccharide through a tailless integrin. *J Immunol* 1997;159:433-438.
84. Bufler P, Stiegler G, Schuchmann M, et al. Soluble lipopolysaccharide receptor (CD14) is released via two different mechanisms from human monocytes and CD14 transfectants. *Eur J Immunol* 1995;25:604-610.

85. Haziot A, Tsuberi BZ, Goyert SM. Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor-alpha in response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 1993;150:5556-5565.
86. Labeta MO, Durieux JJ, Fernandez N, et al. Release from a human monocyte-like cell line of two different soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14. *Eur J Immunol* 1993;23:2144-2151.
87. Bannerman DD, Goldblum SE. Endotoxin induces endothelial barrier dysfunction through protein tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol* 1997;273:L217-226.
88. Frey EA, Miller DS, Jahr TG, et al. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1992;176:1665-1671.
89. Pugin J, Schurer-Maly CC, Leturcq D, et al. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:2744-2748.
90. Tapping RI, Tobias PS. Cellular binding of soluble CD14 requires lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein. *J Biol Chem* 1997;272:23157-23164.
91. Dunzendorfer S, Lee HK, Soldau K, et al. Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses. *FASEB J* 2004;18:1117-1119.
92. Funda DP, Tuckova L, Farre MA, et al. CD14 is expressed and released as soluble CD14 by human intestinal epithelial cells in vitro: lipopolysaccharide activation of epithelial cells revisited. *Infect Immun* 2001;69:3772-3781.
93. Labeta MO, Vidal K, Nores JE, et al. Innate recognition of bacteria in human milk is mediated by a milk-derived highly expressed pattern recognition receptor, soluble CD14. *J Exp Med* 2000;191:1807-1812.
94. Song PI, Abraham TA, Park Y, et al. The expression of functional LPS receptor proteins CD14 and toll-like receptor 4 in human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2867-2877.
95. Zheng J, Watson AD, Kerr DE. Genome-wide expression analysis of lipopolysaccharide-induced mastitis in a mouse model. *Infect Immun* 2006;74:1907-1915.



96. Bannerman DD, Paape MJ, Goff JP, et al. Innate immune response to intramammary infection with *Serratia marcescens* and *Streptococcus uberis*. *Vet Res* 2004;35:681-700.
97. Paape MJ, Lilius EM, Wiitanen PA, et al. Intramammary defense against infections induced by *Escherichia coli* in cows. *Am J Vet Res* 1996;57:477-482.
98. Gupta D, Kirkland TN, Viriyakosol S, et al. CD14 is a cell-activating receptor for bacterial peptidoglycan. *J Biol Chem* 1996;271:23310-23316.
99. Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, et al. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity* 1994;1:509-516.
100. Savedra R, Jr., Delude RL, Ingalls RR, et al. Mycobacterial lipoarabinomannan recognition requires a receptor that shares components of the endotoxin signaling system. *J Immunol* 1996;157:2549-2554.
101. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994;55:97-179.
102. Vogel SN, Fitzgerald KA, Fenton MJ. TLRs: differential adapter utilization by toll-like receptors mediates TLR-specific patterns of gene expression. *Mol Interv* 2003;3:466-477.
103. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001;413:78-83.
104. Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001;2:835-841.
105. Li S, Strelow A, Fontana EJ, et al. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:5567-5572.
106. Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, et al. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 1996;383:443-446.
107. Kollwe C, Mackensen AC, Neumann D, et al. Sequential autophosphorylation steps in the interleukin-1 receptor-associated kinase-1 regulate its availability as an adapter in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* 2004;279:5227-5236.

108. Li L, Cousart S, Hu J, et al. Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells. *J Biol Chem* 2000;275:23340-23345.
109. Swantek JL, Tsen MF, Cobb MH, et al. IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin. *J Immunol* 2000;164:4301-4306.
110. Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, et al. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 2003;198:1043-1055.
111. Oshiumi H, Sasai M, Shida K, et al. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* 2003;278:49751-49762.
112. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003;4:1144-1150.
113. Meylan E, Burns K, Hofmann K, et al. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 2004;5:503-507.
114. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2003;171:4304-4310.
115. Seya T, Oshiumi H, Sasai M, et al. TICAM-1 and TICAM-2: toll-like receptor adapters that participate in induction of type 1 interferons. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:524-529.
116. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649-683.
117. Bone RC. Gram-negative sepsis. Background, clinical features, and intervention. *Chest* 1991;100:802-808.
118. Lee JJ, Burckart GJ. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol* 1998;38:981-993.
119. Martich GD, Boujoukos AJ, Suffredini AF. Response of man to endotoxin. *Immunobiology* 1993;187:403-416.

120. Bierhaus A, Chen J, Liliensiek B, et al. LPS and cytokine-activated endothelium. *Semin Thromb Hemost* 2000;26:571-587.
121. De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R, et al. The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:E83-88.
122. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 2001;13:85-94.
123. Ohtsuka H, Kudo K, Mori K, et al. Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis. *J Vet Med Sci* 2001;63:675-678.
124. Shuster DE, Kehrli ME, Jr., Stevens MG. Cytokine production during endotoxin-induced mastitis in lactating dairy cows. *Am J Vet Res* 1993;54:80-85.
125. Boulanger D, Bureau F, Melotte D, et al. Increased nuclear factor kappaB activity in milk cells of mastitis-affected cows. *J Dairy Sci* 2003;86:1259-1267.
126. Boudjellab N, Chan-Tang HS, Zhao X. Bovine interleukin-1 expression by cultured mammary epithelial cells (MAC-T) and its involvement in the release of MAC-T derived interleukin-8. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2000;127:191-199.
127. Larsen CG, Anderson AO, Oppenheim JJ, et al. Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. *Immunology* 1989;68:31-36.
128. Bannerman DD, Tupper JC, Erwert RD, et al. Divergence of bacterial lipopolysaccharide pro-apoptotic signaling downstream of IRAK-1. *J Biol Chem* 2002;277:8048-8053.
129. Bannerman DD, Erwert RD, Winn RK, et al. TIRAP mediates endotoxin-induced NF-kappaB activation and apoptosis in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295:157-162.
130. Hull C, McLean G, Wong F, et al. Lipopolysaccharide signals an endothelial apoptosis pathway through TNF receptor-associated factor 6-mediated activation of c-Jun NH2-terminal kinase. *J Immunol* 2002;169:2611-2618.
131. Kaiser WJ, Offermann MK. Apoptosis induced by the toll-like receptor adaptor TRIF is dependent on its receptor interacting protein homotypic interaction motif. *J Immunol* 2005;174:4942-4952.

132. Choi KB, Wong F, Harlan JM, et al. Lipopolysaccharide mediates endothelial apoptosis by a FADD-dependent pathway. *J Biol Chem* 1998;273:20185-20188.
133. Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, et al. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci* 2002;115:2603-2611.
134. Olsson S, Sundler R. The role of lipid rafts in LPS-induced signaling in a macrophage cell line. *Mol Immunol* 2006;43:607-612.
135. Blondin C, Le Dur A, Cholley B, et al. Lipopolysaccharide complexed with soluble CD14 binds to normal human monocytes. *Eur J Immunol* 1997;27:3303-3309.
136. Lynn WA, Liu Y, Golenbock DT. Neither CD14 nor serum is absolutely necessary for activation of mononuclear phagocytes by bacterial lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1993;61:4452-4461.
137. Triantafilou M, Triantafilou K, Fernandez N. Rough and smooth forms of fluorescein-labelled bacterial endotoxin exhibit CD14/LBP dependent and independent binding that is influenced by endotoxin concentration. *Eur J Biochem* 2000;267:2218-2226.
138. Troelstra A, de Graaf-Miltenburg LA, van Bommel T, et al. Lipopolysaccharide-coated erythrocytes activate human neutrophils via CD14 while subsequent binding is through CD11b/CD18. *J Immunol* 1999;162:4220-4225.
139. Latz E, Visintin A, Lien E, et al. Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J Biol Chem* 2002;277:47834-47843.
140. Triantafilou M, Morath S, Mackie A, et al. Lateral diffusion of Toll-like receptors reveals that they are transiently confined within lipid rafts on the plasma membrane. *J Cell Sci* 2004;117:4007-4014.
141. Triantafilou M, Triantafilou K. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J Endotoxin Res* 2005;11:5-11.
142. Ogawa S, Lozach J, Benner C, et al. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell* 2005;122:707-721.
143. Burns K, Martinon F, Esslinger C, et al. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* 1998;273:12203-12209.

144. Francois S, El Benna J, Dang PM, et al. Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and phosphorylated Bad. *J Immunol* 2005;174:3633-3642.
145. Remer KA, Brcic M, Jungi TW. Toll-like receptor-4 is involved in eliciting an LPS-induced oxidative burst in neutrophils. *Immunol Lett* 2003;85:75-80.
146. Sabroe I, Dower SK, Whyte MK. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis* 2005;41 Suppl 7:S421-426.
147. Baldrige JR, McGowan P, Evans JT, et al. Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:1129-1138.
148. Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* 2006;10:233.
149. Connor EE, Cates EA, Williams JL, et al. Cloning and radiation hybrid mapping of bovine toll-like receptor-4 (TLR-4) signaling molecules. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;112:302-308.
150. McGuire K, Jones M, Werling D, et al. Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. *Anim Genet* 2006;37:47-50.
151. Menzies M, Ingham A. Identification and expression of Toll-like receptors 1-10 in selected bovine and ovine tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;109:23-30.
152. Szperka ME, Connor EE, Paape MJ, et al. Characterization of bovine FAS-associated death domain gene. *Anim Genet* 2005;36:63-66.
153. Szperka ME, Connor EE, Paape MJ, et al. Sequencing, chromosomal mapping, and functional characterization of bovine FLICE-like inhibitory protein (FLIP). *Cytogenet Genome Res* 2006;112:90-97.
154. Ross K, Yang L, Dower S, et al. Identification of threonine 66 as a functionally critical residue of the interleukin-1 receptor-associated kinase. *J Biol Chem* 2002;277:37414-37421.
155. Stennicke HR, Salvesen GS. Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Differ* 1999;6:1054-1059.

156. Goldammer T, Zerbe H, Molenaar A, et al. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:174-185.
157. Petzl W, Zerbe H, Gunther J, et al. Escherichia coli, but not Staphylococcus aureus triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Vet Res* 2008;39:18.
158. Ibeagha-Awemu EM, Lee JW, Ibeagha AE, et al. Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of toll-like receptor (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells. *Vet Res* 2008;39:11.
159. Yang W, Zerbe H, Petzl W, et al. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from Staphylococcus aureus and E. coli, but S. aureus fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFalpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. *Mol Immunol* 2008;45:1385-1397.
160. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 2002;3:667-672.
161. Ohnishi T, Muroi M, Tanamoto K. MD-2 is necessary for the toll-like receptor 4 protein to undergo glycosylation essential for its translocation to the cell surface. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:405-410.
162. Berczi I, Bertok L, Bereznai T. Comparative studies on the toxicity of Escherichia coli lipopolysaccharide endotoxin in various animal species. *Can J Microbiol* 1966;12:1070-1071.
163. Harlan JM, Harker LA, Striker GE, et al. Effects of lipopolysaccharide on human endothelial cells in culture. *Thromb Res* 1983;29:15-26.
164. Bannerman DD, Tupper JC, Ricketts WA, et al. A constitutive cytoprotective pathway protects endothelial cells from lipopolysaccharide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:14924-14932.
165. Harlan JM, Harker LA, Reidy MA, et al. Lipopolysaccharide-mediated bovine endothelial cell injury in vitro. *Lab Invest* 1983;48:269-274.
166. Pohlman TH, Harlan JM. Human endothelial cell response to lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor is regulated by protein synthesis. *Cell Immunol* 1989;119:41-52.

167. Zhang X, Morrison DC. Lipopolysaccharide-induced selective priming effects on tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med* 1993;177:511-516.
168. Ferreira ME, Coelho MM, Pela IR. Role of the hepatic function in the development of the pyrogenic tolerance to muramyl dipeptide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281:R162-169.
169. Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol* 2000;164:5564-5574.
170. Riedel DD, Kaufmann SH. Differential tolerance induction by lipoarabinomannan and lipopolysaccharide in human macrophages. *Microbes Infect* 2000;2:463-471.
171. Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, et al. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol* 2001;166:5161-5167.
172. Beeson PB. Tolerance to bacterial pyrogen. *J Exp Med* 1947:29-38.
173. Neva FA, Morgan HR. Tolerance to the action of endotoxins of enteric bacilli in patients convalescent from typhoid and paratyphoid fevers. *J Lab Clin Med* 1950;35:911-922.
174. Heyman A, Beeson PB. Influence of various disease states upon the febrile response to intravenous injection of typhoid bacterial pyrogen; with particular reference to malaria and cirrhosis of the liver. *J Lab Clin Med* 1949;34:1400-1403.
175. McCabe WR. Endotoxin Tolerance. Ii. Its Occurrence in Patients with Pyelonephritis. *J Clin Invest* 1963;42:618-625.
176. Rayhane N, Fitting C, Lortholary O, et al. Administration of endotoxin associated with lipopolysaccharide tolerance protects mice against fungal infection. *Infect Immun* 2000;68:3748-3753.
177. Leon P, Redmond HP, Shou J, et al. Interleukin 1 and its relationship to endotoxin tolerance. *Arch Surg* 1992;127:146-151.

178. Lehner MD, Ittner J, Bundschuh DS, et al. Improved innate immunity of endotoxin-tolerant mice increases resistance to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection despite attenuated cytokine response. *Infect Immun* 2001;69:463-471.
179. Coffee KA, Halushka PV, Ashton SH, et al. Endotoxin tolerance is associated with altered GTP-binding protein function. *J Appl Physiol* 1992;73:1008-1013.
180. Ziegler-Heitbrock HW, Wedel A, Schraut W, et al. Tolerance to lipopolysaccharide involves mobilization of nuclear factor kappa B with predominance of p50 homodimers. *J Biol Chem* 1994;269:17001-17004.
181. Ferlito M, Squadrito F, Halushka PV, et al. Signal transduction events in Chinese hamster ovary cells expressing human CD14; effect of endotoxin desensitization. *Shock* 2001;15:291-296.
182. Sanchez-Cantu L, Rode HN, Christou NV. Endotoxin tolerance is associated with reduced secretion of tumor necrosis factor. *Arch Surg* 1989;124:1432-1435; discussion 1435-1436.
183. Zuckerman SH, Evans GF, Butler LD. Endotoxin tolerance: independent regulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor expression. *Infect Immun* 1991;59:2774-2780.
184. Ayala A, Kisala JM, Felt JA, et al. Does endotoxin tolerance prevent the release of inflammatory monokines (interleukin 1, interleukin 6, or tumor necrosis factor) during sepsis? *Arch Surg* 1992;127:191-196; discussion 196-197.
185. Zuckerman SH, Evans GF. Endotoxin tolerance: in vivo regulation of tumor necrosis factor and interleukin-1 synthesis is at the transcriptional level. *Cell Immunol* 1992;140:513-519.
186. Mathison J, Wolfson E, Steinemann S, et al. Lipopolysaccharide (LPS) recognition in macrophages. Participation of LPS-binding protein and CD14 in LPS-induced adaptation in rabbit peritoneal exudate macrophages. *J Clin Invest* 1993;92:2053-2059.
187. Tominaga K, Saito S, Matsuura M, et al. Lipopolysaccharide tolerance in murine peritoneal macrophages induces downregulation of the lipopolysaccharide signal transduction pathway through mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB cascades, but not lipopolysaccharide-incorporation steps. *Biochim Biophys Acta* 1999;1450:130-144.



188. Seatter SC, Bennet T, Li MH, et al. Macrophage endotoxin tolerance. Tumor necrosis factor and interleukin-1 regulation by lipopolysaccharide pretreatment. *Arch Surg* 1994;129:1263-1269; discussion 1270.
189. West MA, Clair L, Bellingham J, et al. Defective lipopolysaccharide-dependent ERK 1/2 activation in endotoxin tolerant murine macrophages is reversed by direct protein kinase C stimulation. *Shock* 2000;14:169-175.
190. Fernando LP, Fernando AN, Ferlito M, et al. Suppression of Cox-2 and TNF-alpha mRNA in endotoxin tolerance: effect of cycloheximide, antinomycin D, and okadaic acid. *Shock* 2000;14:128-133.
191. Pitton C, Fitting C, van Deuren M, et al. Different regulation of TNF alpha and IL-1ra synthesis in LPS-tolerant human monocytes. *Prog Clin Biol Res* 1995;392:523-528.
192. Mathison JC, Virca GD, Wolfson E, et al. Adaptation to bacterial lipopolysaccharide controls lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in rabbit macrophages. *J Clin Invest* 1990;85:1108-1118.
193. Knopf HP, Otto F, Engelhardt R, et al. Discordant adaptation of human peritoneal macrophages to stimulation by lipopolysaccharide and the synthetic lipid A analogue SDZ MRL 953. Down-regulation of TNF-alpha and IL-6 is paralleled by an up-regulation of IL-1 beta and granulocyte colony-stimulating factor expression. *J Immunol* 1994;153:287-299.
194. Alves-Rosa F, Beigier-Bompadre M, Fernandez G, et al. Tolerance to lipopolysaccharide (LPS) regulates the endotoxin effects on Shiga toxin-2 lethality. *Immunol Lett* 2001;76:125-131.
195. Seatter SC, Li MH, Bubrick MP, et al. Endotoxin pretreatment of human monocytes alters subsequent endotoxin-triggered release of inflammatory mediators. *Shock* 1995;3:252-258.
196. West MA, Li MH, Seatter SC, et al. Pre-exposure to hypoxia or septic stimuli differentially regulates endotoxin release of tumor necrosis factor, interleukin-6, interleukin-1, prostaglandin E2, nitric oxide, and superoxide by macrophages. *J Trauma* 1994;37:82-89; discussion 89-90.
197. West MA, LeMieur T, Clair L, et al. Protein kinase C regulates macrophage tumor necrosis factor secretion: direct protein kinase C activation restores tumor necrosis factor production in endotoxin tolerance. *Surgery* 1997;122:204-211; discussion 211-202.

198. Rodrick ML, Moss NM, Grbic JT, et al. Effects of in vivo endotoxin infusions on in vitro cellular immune responses in humans. *J Clin Immunol* 1992;12:440-450.
199. Flohe S, Dominguez Fernandez E, Ackermann M, et al. Endotoxin tolerance in rats: expression of TNF-alpha, IL-6, IL-10, VCAM-1 AND HSP 70 in lung and liver during endotoxin shock. *Cytokine* 1999;11:796-804.
200. Ogle CK, Guo X, Chance WT, et al. Induction of endotoxin tolerance in rat bone marrow cells by in vivo infusion of tumor necrosis factor. *Crit Care Med* 1997;25:827-833.
201. Greisman SE, Hornick RB. The nature of endotoxin tolerance. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1975;86:43-50.
202. Kertai P, Ujhelyi K, Gerhardt V. Effect of endotoxin pretreatment on surgical lethality in animal experiments. *Acta Med Acad Sci Hung* 1966;22:75-80.
203. Zingarelli B, Halushka PV, Caputi AP, et al. Increased nitric oxide synthesis during the development of endotoxin tolerance. *Shock* 1995;3:102-108.
204. Geisel J, Cook JA, Ashton SH, et al. Endotoxin tolerance is associated with decreased prostaglandin H synthases-1 and -2. *Am J Physiol* 1994;267:C1067-1072.
205. Chen H, Halushka PV, Cook JA. Endotoxin tolerance: effects on lethality and macrophage thromboxane (B2) and interleukin 6 production. *Shock* 1994;1:366-371.
206. Kaufmann A, Gemsa D, Sprenger H. Differential desensitization of lipopolysaccharide-inducible chemokine gene expression in human monocytes and macrophages. *Eur J Immunol* 2000;30:1562-1567.
207. Cavaillon JM, Marie C, Pitton C, et al. The production of TNF alpha and IL-8 in whole blood assays are differently regulated upon activation by LPS. *Prog Clin Biol Res* 1995;392:433-439.
208. Song M, Phelps DS. Comparison of SP-A and LPS effects on the THP-1 monocytic cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L110-117.
209. West MA, Baker J, Bellingham J, et al. Discordant reprogramming of LPS-stimulated cytokine gene transcription and secretion by macrophages after LPS pretreatment. *J Surg Res* 1996;63:209-214.

210. West MA, Bennet T, Seatter SC, et al. LPS pretreatment reprograms macrophage LPS-stimulated TNF and IL-1 release without protein tyrosine kinase activation. *J Leukoc Biol* 1997;61:88-95.
211. Medvedev AE, Henneke P, Schromm A, et al. Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4. *J Immunol* 2001;167:2257-2267.
212. Durando MM, Meier KE, Cook JA. Endotoxin activation of mitogen-activated protein kinase in THP-1 cells; diminished activation following endotoxin desensitization. *J Leukoc Biol* 1998;64:259-264.
213. Ropert C, Almeida IC, Closel M, et al. Requirement of mitogen-activated protein kinases and I kappa B phosphorylation for induction of proinflammatory cytokines synthesis by macrophages indicates functional similarity of receptors triggered by glycosylphosphatidylinositol anchors from parasitic protozoa and bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001;166:3423-3431.
214. Kraatz J, Clair L, Rodriguez JL, et al. Macrophage TNF secretion in endotoxin tolerance: role of SAPK, p38, and MAPK. *J Surg Res* 1999;83:158-164.
215. Mendez C, Jaffray C, Wong V, et al. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the induction of tolerance to hemorrhagic and endotoxic shock. *J Surg Res* 2000;91:165-170.
216. Nomura F, Akashi S, Sakao Y, et al. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2000;164:3476-3479.
217. Kastenbauer S, Ziegler-Heitbrock HW. NF-kappaB1 (p50) is upregulated in lipopolysaccharide tolerance and can block tumor necrosis factor gene expression. *Infect Immun* 1999;67:1553-1559.
218. Wahlstrom K, Bellingham J, Rodriguez JL, et al. Inhibitory kappaBalpha control of nuclear factor-kappaB is dysregulated in endotoxin tolerant macrophages. *Shock* 1999;11:242-247.
219. West MA, Clair L, Kraatz J, et al. Endotoxin tolerance from lipopolysaccharide pretreatment induces nuclear factor-kappaB alterations not present in C3H/HeJ mice. *J Trauma* 2000;49:298-305.

220. Ziegler-Heitbrock HW. Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. *J Inflamm* 1995;45:13-26.
221. Blackwell TS, Blackwell TR, Christman JW. Induction of endotoxin tolerance depletes nuclear factor-kappaB and suppresses its activation in rat alveolar macrophages. *J Leukoc Biol* 1997;62:885-891.
222. Kohler NG, Joly A. The involvement of an LPS inducible I kappa B kinase in endotoxin tolerance. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;232:602-607.
223. Shames BD, Meldrum DR, Selzman CH, et al. Increased levels of myocardial IkappaB-alpha protein promote tolerance to endotoxin. *Am J Physiol* 1998;275:H1084-1091.
224. Prins JM, Kuijper EJ, Mevissen ML, et al. Release of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 during antibiotic killing of Escherichia coli in whole blood: influence of antibiotic class, antibiotic concentration, and presence of septic serum. *Infect Immun* 1995;63:2236-2242.
225. Ronco C, Brendolan A, Lonnemann G, et al. A pilot study of coupled plasma filtration with adsorption in septic shock. *Crit Care Med* 2002;30:1250-1255.
226. Marie C, Fitting C, Muret J, et al. Interleukin 8 production in whole blood assays: Is interleukin 10 responsible for the downregulation observed in sepsis? *Cytokine* 2000;12:55-61.
227. Berg DJ, Kuhn R, Rajewsky K, et al. Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J Clin Invest* 1995;96:2339-2347.
228. Ayala A, Knotts JB, Ertel W, et al. Role of interleukin 6 and transforming growth factor-beta in the induction of depressed splenocyte responses following sepsis. *Arch Surg* 1993;128:89-94; discussion 94-85.
229. Chen W, Frank ME, Jin W, et al. TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* 2001;14:715-725.
230. Jones SB, Westfall MV, Sayeed MM. Plasma catecholamines during E. coli bacteremia in conscious rats. *Am J Physiol* 1988;254:R470-477.
231. Luger TA, Kalden D, Scholzen TE, et al. alpha-melanocyte-stimulating hormone as a mediator of tolerance induction. *Pathobiology* 1999;67:318-321.

232. Delgado M, Pozo D, Martinez C, et al. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production by macrophages: in vitro and in vivo studies. *J Immunol* 1999;162:2358-2367.
233. Annane D, Cavaillon JM. Corticosteroids in sepsis: from bench to bedside? *Shock* 2003;20:197-207.
234. Choudhry MA, Ahmad S, Ahmed Z, et al. Prostaglandin E2 down-regulation of T cell IL-2 production is independent of IL-10 during gram-negative sepsis. *Immunol Lett* 1999;67:125-130.
235. Njemini R, Lambert M, Demanet C, et al. Elevated serum heat-shock protein 70 levels in patients with acute infection: use of an optimized enzyme-linked immunosorbent assay. *Scand J Immunol* 2003;58:664-669.
236. Adib-Conquy M, Adrie C, Moine P, et al. NF-kappaB expression in mononuclear cells of patients with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1877-1883.
237. Adib-Conquy M, Asehnoune K, Moine P, et al. Long-term-impaired expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha in peripheral blood mononuclear cells of trauma patients. *J Leukoc Biol* 2001;70:30-38.
238. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, et al. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002;110:191-202.
239. Escoll P, del Fresno C, Garcia L, et al. Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:465-472.
240. Fukao T, Koyasu S. PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol* 2003;24:358-363.
241. Learn CA, Boger MS, Li L, et al. The phosphatidylinositol 3-kinase pathway selectively controls sIL-1RA not interleukin-1beta production in the septic leukocytes. *J Biol Chem* 2001;276:20234-20239.
242. Janssens S, Burns K, Tschopp J, et al. Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr Biol* 2002;12:467-471.

243. Adib-Conquy M, Adrie C, Fitting C, et al. Up-regulation of MyD88s and SIGIRR, molecules inhibiting Toll-like receptor signaling, in monocytes from septic patients. *Crit Care Med* 2006;34:2377-2385.
244. Zhang G, Ghosh S. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem* 2002;277:7059-7065.
245. Wald D, Qin J, Zhao Z, et al. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 2003;4:920-927.
246. Nakagawa R, Naka T, Tsutsui H, et al. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity* 2002;17:677-687.
247. Sato S, Nomura F, Kawai T, et al. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol* 2000;165:7096-7101.
248. Iwami KI, Matsuguchi T, Masuda A, et al. Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J Immunol* 2000;165:6682-6686.
249. Divanovic S, Trompette A, Atabani SF, et al. Inhibition of TLR-4/MD-2 signaling by RP105/MD-1. *J Endotoxin Res* 2005;11:363-368.
250. Brint EK, Xu D, Liu H, et al. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol* 2004;5:373-379.
251. Chuang TH, Ulevitch RJ. Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2004;5:495-502.
252. Wang T, Chuang TH, Ronni T, et al. Flightless I homolog negatively modulates the TLR pathway. *J Immunol* 2006;176:1355-1362.
253. Williams KL, Lich JD, Duncan JA, et al. The CATERPILLER protein monarch-1 is an antagonist of toll-like receptor-, tumor necrosis factor alpha-, and Mycobacterium tuberculosis-induced pro-inflammatory signals. *J Biol Chem* 2005;280:39914-39924.
254. Boone DL, Turer EE, Lee EG, et al. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol* 2004;5:1052-1060.

255. Rauh MJ, Sly LM, Kalesnikoff J, et al. The role of SHIP1 in macrophage programming and activation. *Biochem Soc Trans* 2004;32:785-788.
256. Takeshita F, Ishii KJ, Kobiyama K, et al. TRAF4 acts as a silencer in TLR-mediated signaling through the association with TRAF6 and TRIF. *Eur J Immunol* 2005;35:2477-2485.
257. Mashima R, Saeki K, Aki D, et al. FLN29, a novel interferon- and LPS-inducible gene acting as a negative regulator of toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2005;280:41289-41297.
258. Shinohara H, Inoue A, Toyama-Sorimachi N, et al. Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of lipopolysaccharide-induced signaling. *J Exp Med* 2005;201:333-339.
259. Hammer M, Mages J, Dietrich H, et al. Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock. *J Exp Med* 2006;203:15-20.
260. Zhao Q, Wang X, Nelin LD, et al. MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. *J Exp Med* 2006;203:131-140.
261. Zhao F, Yuan Q, Sultzler BM, et al. The involvement of Ran GTPase in lipopolysaccharide endotoxin-induced responses. *J Endotoxin Res* 2001;7:53-56.
262. Kuwert EK, Marcus I, Werner J, et al. Some experiences with human diploid cell strain-(HDCS) rabies vaccine in pre- and post-exposure vaccinated humans. *Dev Biol Stand* 1978;40:79-88.
263. McCall CE, Yoza BK. Gene silencing in severe systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:763-767.
264. Wysocka M, Montaner LJ, Karp CL. Flt3 ligand treatment reverses endotoxin tolerance-related immunoparalysis. *J Immunol* 2005;174:7398-7402.
265. Helminen M, Vesikari T. Interleukin-1 production in bacterial meningitis. *Scand J Infect Dis* 1990;22:105-108.
266. Weighardt H, Heidecke CD, Emmanuilidis K, et al. Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon-gamma-resistant defects of monocyte cytokine production. *Surgery* 2000;127:309-315.

267. Munford RS, Hall CL. Detoxification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) by a human neutrophil enzyme. *Science* 1986;234:203-205.
268. Lu M, Varley AW, Ohta S, et al. Host inactivation of bacterial lipopolysaccharide prevents prolonged tolerance following gram-negative bacterial infection. *Cell Host Microbe* 2008;4:293-302.
269. McDermott CM, Cullor JS, Fenwick BW. Intracellular and extracellular enzymatic deacylation of bacterial endotoxin during localized inflammation induced by *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1991;59.
270. McDermott CM, Morrill JL, Fenwick BW. Deacylation of endotoxin during natural cases of bovine mastitis. *J Dairy Sci* 1991;1227-1234.
271. Singh J, Sidhu SS, Dhaliwal GS, et al. Effectiveness of lipopolysaccharide as an intrauterine immunomodulator in curing bacterial endometritis in repeat breeding cross-bred cows. *Anim Reprod Sci* 2000;59:159-166.
272. Bertok L. Radio-detoxified endotoxin activates natural immunity: a review. *Pathophysiology* 2005;12:85-95.
273. Masihi KN, Lange W, Brehmer W, et al. Immunobiological activities of nontoxic lipid A: enhancement of nonspecific resistance in combination with trehalose dimycolate against viral infection and adjuvant effects. *Int J Immunopharmacol* 1986;8:339-345.
274. Cluff CW, Baldrige JR, Stover AG, et al. Synthetic toll-like receptor 4 agonists stimulate innate resistance to infectious challenge. *Infect Immun* 2005;73:3044-3052.
275. Stover AG, Da Silva Correia J, Evans JT, et al. Structure-activity relationship of synthetic toll-like receptor 4 agonists. *J Biol Chem* 2004;279:4440-4449.
276. Persing DH, Coler RN, Lacy MJ, et al. Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. *Trends Microbiol* 2002;10:S32-37.
277. Andonegui G, Bonder CS, Green F, et al. Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J Clin Invest* 2003;111:1011-1020.
278. Kerfoot SM, Kubes P. Local coordination verses systemic dysregulation: complexities in leukocyte recruitment revealed by local and systemic activation of TLR4 in vivo. *J Leukoc Biol* 2005;77:862-867.



279. Ohta S, Bahrun U, Shimazu R, et al. Induction of long-term lipopolysaccharide tolerance by an agonistic monoclonal antibody to the toll-like receptor 4/MD-2 complex. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:1131-1136.
280. Alves-Filho JC, Benjamim C, Tavares-Murta BM, et al. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100 Suppl 1:223-226.
281. Alves-Filho JC, de Freitas A, Russo M, et al. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. *Crit Care Med* 2006;34:461-470.
282. Mullarkey M, Rose JR, Bristol J, et al. Inhibition of endotoxin response by e5564, a novel Toll-like receptor 4-directed endotoxin antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:1093-1102.
283. Teghanemt A, Zhang D, Levis EN, et al. Molecular basis of reduced potency of underacylated endotoxins. *J Immunol* 2005;175:4669-4676.
284. Maas PJ, Colditz IG. Desensitization of the acute inflammatory response in skin and mammary gland of sheep. *Immunology* 1987;61:215-219.
285. Kauf AC, Vinyard BT, Bannerman DD. Effect of intramammary infusion of bacterial lipopolysaccharide on experimentally induced *Staphylococcus aureus* intramammary infection. *Res Vet Sci* 2007;82:39-46.
286. Shuster DE, Harmon RJ. Lactating cows become partially refractory to frequent intramammary endotoxin infusions: recovery of milk yield despite a persistently high somatic cell count. *Res Vet Sci* 1991;51:272-277.
287. Suojala L, Orro T, Jarvinen H, et al. Acute phase response in two consecutive experimentally induced *E. coli* intramammary infections in dairy cows. *Acta Vet Scand* 2008;50:18.
288. Zhu YM, Miao JF, Zhang YS, et al. CpG-ODN enhances mammary gland defense during mastitis induced by *Escherichia coli* infection in goats. *Vet Immunol Immunopathol* 2007;120:168-176.
289. Burkhardt F. *Mikrobiologische Diagnostik*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1992.

290. Johnson JR, Stell AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* 2000;181:261-272.
291. Muller D, Greune L, Heusipp G, et al. Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:3380-3390.
292. Morath S, Geyer A, Hartung T. Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med* 2001;193:393-397.
293. Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, et al. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol* 2000;165:618-622.
294. Rosenberger G. *Die klinische Untersuchung des Rindes*. 3. ed. Berlin; Hamburg;: Parey, 1990.
295. Ormerod MG. An introduction to fluorescence technology In: Ormerod MG, ed. *Flow cytometry - a practical approach*: IRL Press at Oxford University Press, New York, 1990.
296. Radbruch A. Flow cytometry and cell sorting In: Radbruch A, ed. *Immunofluorescence: basic considerations*: Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1992.
297. Petzl W. Untersuchungen zu frühen Erreger-Wirts-Interaktionen bei der Mastitis des Rindes. Diss. vet. med. Arbeitsgruppe Immunologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover und Klinik für Wiederkäuer der Ludwig-Maximilians-Universität München, 2005.
298. Prakash BS, Meyer HH, Schallenberger E, et al. Development of a sensitive enzymeimmunoassay (EIA) for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique. *J Steroid Biochem* 1987;28:623-627.
299. Meyer HHD, Rohleder M, Streich WJ, et al. Sexualsteroidprofile und Ovaraktivitäten des Pandaweibchens YAN YAN im Berliner Zoo. *Berl MünchTierärztlWochenschr* 1997:143-147.

300. Guidry AJ, Paape MJ, Pearson RE. Effects of estrus and exogenous estrogen on circulating neutrophils and milk somatic cell concentration, neutrophil phagocytosis, and occurrence of clinical mastitis in cows. *Am J Vet Res* 1975;36:1555-1560.
301. King JO. The effect of oestrus on milk production in cows. *Vet Rec* 1977;101:107-108.
302. Cowan CM, Larson LL. Relationship of the estrous cycle to milk composition. *J Dairy Sci* 1979;62:546-550.
303. Malcolm KC, Arndt PG, Manos EJ, et al. Microarray analysis of lipopolysaccharide-treated human neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284:L663-670.
304. Zhao B, Bowden RA, Stavchansky SA, et al. Human endothelial cell response to gram-negative lipopolysaccharide assessed with cDNA microarrays. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281:C1587-1595.
305. Chitko-McKown CG, Fox JM, Miller LC, et al. Gene expression profiling of bovine macrophages in response to Escherichia coli O157:H7 lipopolysaccharide. *Dev Comp Immunol* 2004;28:635-645.
306. Franchini M, Schweizer M, Matzener P, et al. Evidence for dissociation of TLR mRNA expression and TLR agonist-mediated functions in bovine macrophages. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;110:37-49.
307. Nickerson SC, Boddie RL, Owens WE, et al. Effects of novel intramammary device models on incidence of mastitis after experimental challenge. *J Dairy Sci* 1990;73:2774-2784.
308. Shuster DE, Lee EK, Kehrli ME, Jr. Bacterial growth, inflammatory cytokine production, and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows within ten days after calving, compared with cows at midlactation. *Am J Vet Res* 1996;57:1569-1575.
309. Pyorala S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res* 2003;34:565-578.
310. Doggweiler R, Hess E. Zellgehalt in der Milch ungeschädigter Euter. *Milchwissensch* 1983:5-8.

311. Köss C. Durchflusszytometrische Differenzierung sowie phänotypische und funktionelle Eigenschaften boviner Milchezellen unter Berücksichtigung der Eutergesundheit. Hannover: Tierärztl. Hochschule, 2004.
312. Hamann J, Krömker V. Potential of specific milk composition variables for cow health management. *Livest Prod Sci* 1997;201-208.
313. Du Preez JH. Comparison of various criteria for determining the health status of the bovine udder. *J S Afr Vet Assoc* 1987;58:9-14.
314. Vandeputte-Van Messom G, Burvenich C, Roets E, et al. Classification of newly calved cows into moderate and severe responders to experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *J Dairy Res* 1993;60:19-29.
315. McClenahan D, Fagliari J, Evanson O, et al. Role of inflammatory mediators in priming, activation, and deformability of bovine neutrophils. *Am J Vet Res* 2000;61:492-498.
316. Dahnke J. CpG Motive und ausgewählte Toll-like-Rezeptor-Liganden: Ihre modulatorische Interaktion mit bovinen Leukozyten. Diss. med. vet., Tierärztl. Hochschule, Hannover, 2003.
317. Paape MJ, Wergin, W. P., Guildry, A. J., Schultze, W. D. Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. *Adv Exp Med Biol* 1981:555-578.
318. Sladek Z, Rysanek D. Tissue pool neutrophils of the bovine mammary gland: ultrastructural features during in vitro senescence. *Anat Histol Embryol* 2005;34:159-166.
319. Koess C, Hamann J. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *J Dairy Res* 2008;75:225-232.
320. Mehrzad J, Janssen D, Duchateau L, et al. Increase in *Escherichia coli* inoculum dose accelerates CD8+ T-cell trafficking in the primiparous bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 2008;91:193-201.
321. Kelly GS. Bovine colostrums: a review of clinical uses. *Altern Med Rev* 2003;8:378-394.
322. Reisser D, Pance A, Jeannin JF. Mechanisms of the antitumoral effect of lipid A. *Bioessays* 2002;24:284-289.

## 9 Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Holm Zerbe für die Überlassung des Themas und für die engagierte und motivierende Betreuung. Jederzeit stand seine Tür bei Fragen oder Sorgen offen. Sein großes persönliches Engagement und seine stets prompte Hilfeleistung haben sehr zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. Wolfram Petzl für hervorragende Betreuung und gute Zusammenarbeit, herzliche Atmosphäre und Förderung der Arbeit. Seine fachliche Kompetenz und sein praktisches Können haben mir sehr geholfen, so manche Hürde zu meistern.

Der Firma Pfizer Animal Health danke ich für die Finanzierung des Projekts. Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Dr. Leopold Goetze, der durch sein Engagement und sein Vertrauen sowie durch konstruktive inhaltliche Diskussion einen nicht unerheblichen Beitrag für das Gelingen der Studie leistete.

Für die intensive Einarbeitung in die Technik und die Methoden sowie die Hilfestellung bei vielen auftauchenden Fragen danke ich Herrn Daniel Mehne, Frau Heidi Mayrhofer, Herrn Dr. Frank Weber und Frau Dr. Sonja Meyer.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Tierpflegerinnen und Tierpflegern der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der LMU München für die umsichtige Versorgung und Betreuung der Versuchstiere und für die Hilfe bei anfallenden Manipulationen an den Tieren. Namentlich möchte ich mich bei Frau Emma Eichner und Herrn Matthias Berger für die stets unkomplizierte und konstruktive Hilfe, vor allem auch beim Transport der Versuchstiere, besonders herzlich bedanken.

Ein ganz herzlicher Dank gilt Frau Dr. Carola Sauter-Louis für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten und bei so manchen Computerproblemen.

Außerdem möchte ich mich bei den Sekretärinnen Frau Rita Radloff und Frau Sybille Kirsch bedanken, die all die großen und kleinen Anliegen stets zuvorkommend, zügig und immer mit einem freundlichen Wort bearbeitet haben.

Frau Monika Altmann, Frau Christina Beyer und Frau Ingrid Hartmann vom klinischen Labor der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der LMU München möchte ich danken für die zuverlässige, zügige Bearbeitung der Proben und die nette Zusammenarbeit sowie Frau Aranka Bilicki für die kleinen und großen Handgriffe während der harten Tage.

Danken möchte ich auch Frau Priv.-Doz. Dr. Angela Hafner-Marx und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Pathologie des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit Oberschleißheim für die zuvorkommende Hilfe bei der Sektion der Versuchstiere.

Meiner Mitdoktorandin Frau Eva Kemeter danke ich ganz besonders für die stets kollegiale Zusammenarbeit, die praktische Hilfe, die moralische Unterstützung und die vielen kleinen Aufmerksamkeiten, die Unzeiten leichter überstehen ließen. Bei Frau Katharina Waldmüller möchte ich mich ganz herzlich fürs Korrekturlesen bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dir, liebe Martina. Ohne Deine großartige Unterstützung und Dein Verständnis wäre diese Arbeit nie möglich gewesen.